

Die altersabhängige Entwicklung der Reninexpression in der Connexin 40 und Aldosteronsynthase Doppel-Knockout-Maus



DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MEDIZIN (DR. MED.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND
VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Franz-Xaver Schinabeck
aus Bad Kötzing
im Jahr 2017

Die vorliegende Arbeit entstand in dem Zeitraum von Januar 2013 bis Mai 2017 unter der Anleitung von Prof. Dr. Armin Kurtz und unter der Betreuung von Dr. Katharina Machura und Dr. Björn Neubauer am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Die Arbeit wurde angeleitet von: Herr Prof. Dr. Armin Kurtz

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am 26.06.17

Datum der Promotion: 05.09.2017

Prüfungskommission: 1. Prüfer: Prof. Dr. Armin Kurtz
 2. Prüfer: PD Dr. Dr. Barbara Braunger

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	6
1.1	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	7
1.1.1	Regelkreis und Wirkung	7
1.1.2	Renin	9
1.1.3	Aldosteron	11
1.1.4	Aldosteronsynthese	12
1.2	Connexine und Gap junctions	13
1.2.1	Aufbau und Funktion von Gap junctions	13
1.2.2	Connexine	15
1.2.3	Connexine im juxtaglomerulären Apparat	16
1.3	Fragestellung und Zielsetzung	18
2.	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Material	21
2.1.1	Geräte	21
2.1.2	Verbrauchsmaterial	23
2.1.3	Chemikalien, Enzyme, Kits	24
2.1.4	Primer	26
2.1.5	Antikörper	26
2.1.6	Lösungen und Puffer	27
2.1.7	Software und Internetdienste	29
2.1.8	Statistik	29
2.2	Methoden	30
2.2.1	Versuchstiere	30
2.2.2	Histologische Methoden	30
2.2.2.1	Fixierung des Nierengewebes und Organentnahme	30
2.2.2.2	Paraffineinbettung	31
2.2.2.2.1	Anfertigung von Paraffinschnittserien und Entparaffinierung	32
2.2.2.3	Immunhistochemische Färbung	33
2.2.3	Dreidimensionale Rekonstruktion	35

2.2.3.1	Bildaufnahme und Digitalisierung	35
2.2.3.2	Bildstapelerstellung mit Hilfe von Image J	36
2.2.3.3	3D-Rekonstruktion mittels Amira	37
2.2.3.3.1	Übertragung der Daten in den dreidimensionalen Raum	37
2.2.3.3.2	Separierung der Farbkanäle	37
2.2.3.3.3	Alignierung	38
2.2.3.3.4	Datensegmentierung	39
2.2.3.3.5	Oberflächengenerierung	40
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	41
2.2.4.1	Genotypisierung	41
2.2.4.1.1	Genotypisierung Aldosteronsynthese	42
2.2.4.1.2	Genotypisierung Connexin 40.....	44
2.2.4.2	Semi-Quantitative Bestimmung der Reninexpression	46
2.2.4.2.1	Isolierung von RNA aus Nieren.....	46
2.2.4.2.2	Synthese von cDNA	47
2.2.4.2.3	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion	48
3.	ERGEBNISSE.....	50
3.1	Reninexpressionsmuster der adulten Wildtyp-Maus	51
3.2	Die 4 Wochen alte Maus	53
3.2.1	Die 4 Wochen alte Aldosteronsynthese-Connexin 40-Doppel-Knockout-Maus	53
3.2.2	Die 4 Wochen alte Wildtyp-Maus	58
3.3	Die 10 Wochen alte Maus	59
3.3.1	Die 10 Wochen alte AS-Cx40-/-Maus	59
3.3.2	Die 10 Wochen alte Wildtyp-Maus	63
3.4	Die 16 Wochen alte Maus	64
3.4.1	Die 16 Wochen alte AS-Cx40 -/- Maus.....	64
3.4.2	Die 16 Woche alte Wildtyp-Maus	69
3.5	Die 22 Wochen alte Maus	70
3.5.1	Die 22 Wochen alte AS-CX40-/-Maus	70
3.5.2	Die 22 Wochen alte Wildtyp-Maus	74
3.6	Die 34 Wochen alte Maus	75
3.6.1	Die 34 Wochen alte AS-Cx40-/-Maus	75
3.6.2	Die 34 Wochen alte Wildtyp-Maus	80

3.7	Die 46 Wochen alte Maus	81
3.7.1	Die 46 Wochen alte AS-Cx40/--Maus	81
3.7.2	Die 46 Wochen alte Wildtyp-Maus	86
3.8	Analyse der quantitativen Reninexpression	87
4.	DISKUSSION.....	89
5.	ZUSAMMENFASSUNG	97
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	100
7.	ANHANG	112
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	113
7.2	Abkürzungsverzeichnis.....	117
7.3	Danksagung.....	120
7.4	Erklärung.....	121

1. Einleitung

1.1 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

1.1.1 Regelkreis und Wirkung

Eines der wichtigsten Systeme zur Regulation des systemischen Blutdrucks hat seinen Ursprung in den Nieren, das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Ausgehend von spezialisierten Zellen, welche in der Gefäßwand der Vasa afferentia der Glomeruli liegen, wird Renin freigesetzt, ein proteolytisches Enzym, das eine komplexe Signalkaskade in Gang setzt. Ins Blutplasma sezerniert, katalysiert es die Hydrolyse des aus der Leber stammenden α_2 -Glykoproteins Angiotensinogen in das Dekapeptid Angiotensin I. Das biologisch inaktive Angiotensin I wird durch Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), welches vorwiegend an der Oberfläche der Endothelzellen in den Gefäßen der Lungen gebildet wird, durch hydrolytische Abspaltung zweier Aminosäuren zum aktiven Oktapeptid Angiotensin II. Dieses Peptidhormon stellt nun das eigentliche Effektorhormon dar, welches seine Wirkung über die Angiotensin II-Rezeptoren erzielt (Levens et al. 1981; Hackenthal et al. 1990; Unger et al. 1996). Hierbei wird zwischen den Subtypen Angiotensin AT1-Rezeptor (AT1R) und Angiotensin AT2-Rezeptor (AT2R) unterschieden (Bumpus et al. 1991). Davon wiederum wird der AT1-Rezeptor im Erwachsenenalter deutlich stärker exprimiert, während der AT2-Rezeptor in der fetalen Phase hochreguliert ist (Grady et al. 1991; Gasparo et al. 2000).

Über den Angiotensin AT1-Rezeptor wird eine Vasokonstriktion der Arteriolen erreicht, was mit einer Steigerung des peripheren Gefäßwiderstandes einhergeht und somit zu einer Blutdrucksteigerung führt (Hackenthal et al. 1990). An den efferenten Arteriolen der Glomeruli bewirkt die Vasokonstriktion eine gesteigerte glomerulären Filtrationsrate. Weiterhin kommt es zu einer Angiotensin II vermittelten Steigerung der Natriumresorption im proximalen Tubus (Geibel et al. 1990).

Eine weitere Wirkung ist die vermehrte Sekretion des Hormon Adiuretin aus dem Hinterlappen der Hypophyse (Touyz 2003). Dieses führt in den Nieren über den Einbau von Aquaporinen in die apikale Wand der Sammelrohre zu

einer verstärkten Rückresorption von Wasser und somit einer weiteren Blutdrucksteigerung über ein vergrößertes Blutvolumen.

Indirekt wird dies auch erreicht, indem über eine Stimulation im Hypothalamus ein vermehrtes Durstgefühl entsteht, was durch eine vermehrte Flüssigkeitsaufnahme zu einer weiteren Erhöhung des Flüssigkeitshaushaltes führt.

In der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde bewirkt Angiotensin II die Freisetzung des Mineralokortikoids Aldosteron. Über Bindung an Mineralokortikoidrezeptoren kommt es zu einer verstärkten Natrium- und Wasserretention und somit zu einer Zunahme des extrazellulären Volumens, was wiederum mit einer Blutdrucksteigerung einhergeht.

Eine negative Rückkopplung hemmt die Signalkaskade. Ein erhöhter Blutdruck, Angiotensin II und Aldosteron wirken inhibitorisch auf die Freisetzung von Renin (Moffett et al. 1986; Hackenthal et al. 1990; Kurtz und Wagner 1999).

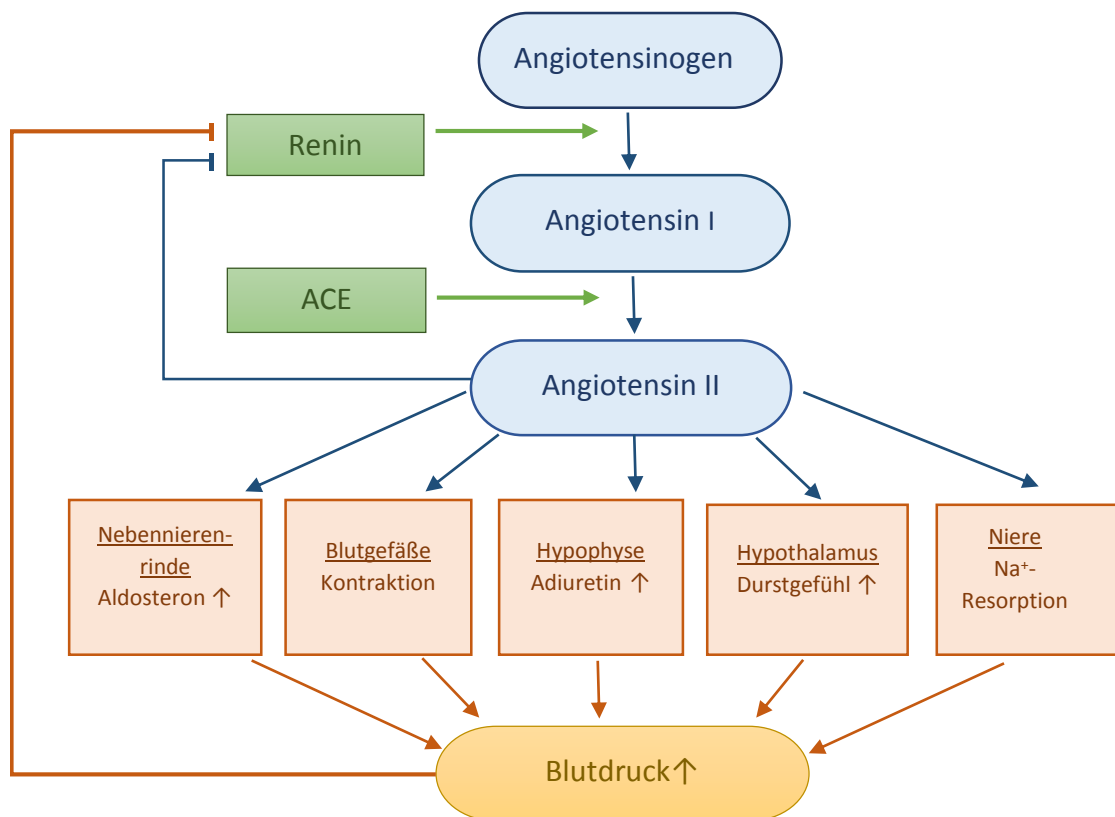


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Signalkaskade des RAAS

1.1.2 Renin

Bei dem im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Regelkreis ist weder die Konzentration von Angiotensin noch von ACE limitierend, sondern die Produktions- und Sekretionsrate von Renin (Kurtz 1989; Peters und Clausmeyer 2002). Der größte Teil wird dabei vom zirkulierenden Renin in den Nieren gebildet. Daneben konnte auch in anderen Organen, wie zum Beispiel in Herz, Nebenniere, Pankreas und Gehirn (Peters und Clausmeyer 2002; Lavoie et al. 2004; Leung und Chappell 2003) eine geringe Synthese von Renin nachgewiesen werden.

In der Niere erfolgt die Synthese und Speicherung von Renin typischerweise in den juxtaglomerulären Epitheloidzellen (JG-Zellen) der Media der afferenten Arteriolen (Barajas 1979; Taugner et al. 1979).

Das Renin wird in diesen Zellen als Prä-Pro-Renin transkribiert und translatiert (Pratt et al. 1983). Anschließend erfolgt die Abspaltung einer Signalsequenz, welche die Translokation in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums bewirkt. Dabei entsteht das enzymatisch inaktive Prorenin, dies wird in sekretorischen Vesikeln des Golgi-Apparates gespeichert. Durch Verkürzung des N-Terminus um 46 Aminosäuren kommt es zur Aktivierung zum enzymatisch aktiven Renin (Dzau et al. 1982; Catanzaro et al. 1983). Bis zur Freisetzung in den systemischen Kreislauf durch Exozytose wird es hier gespeichert (Taugner et al. 1987).

Die Regulation der Sekretion ist sehr komplex und von vielen systemischen und lokalen Faktoren beeinflusst.

Eine bedeutende Rolle spielt dabei der Blutdruck, dessen Absinken zur Aktivierung des RAAS und damit zur Reninfreisetzung führt (Taugner et al. 1984a). Verantwortlich hierfür sind renale Barorezeptoren. Diese registrieren einen systemischen Blutdruckabfall sowie auch eine Verminderung des renalen Druckes, zum Beispiel bedingt durch eine Stenose der Arteria renalis (Goldblatt et al. 1976).

Ein weiterer wichtiger Faktor der Regulation ist der Salzhaushalt des Körpers, da über diesen eine Regulierung des Wasserhaushaltes und somit auch des Blutdruckes möglich ist. Ein bislang noch nicht zweifelsfrei belegter Rückkopplungsmechanismus beeinflusst dabei die Freisetzung von Renin.

Dabei werden über Zellen der Macula densa, die in der Wand des distalen Tubulus liegen, Änderungen des NaCl-Gehalt der Tubulusflüssigkeit registriert (Goormaghtigh 1937; Vander 1967). Die Macula densa steht in direktem Kontakt zu den afferenten Arteriolen des jeweiligen Glomerulus und geben bei einer Veränderung des Salzgehalt im Tubulus ein entsprechendes Signal an die Renin-bildenden Zellen weiter (Schnermann 1998).

Auch kann das sympathische Nervensystem Einfluss auf die reninhaltigen Zellen nehmen. So werden über Adrenalin und Noradrenalin β_1 -adrenerge Rezeptoren auf den reninbildenden Zellen stimuliert, die eine Reninfreisetzung bewirken (Hackenthal und Taugner 1986; Holmer et al. 1997).

1.1.3 Aldosteron

Das Steroidhormon Aldosteron stellt den wichtigsten Vertreter der Mineralocorticoide dar und ist einer der bedeutensten Regulatoren des Elektrolythaushaltes.

Aldosteron wird in der Zona glomerulosa, der äußeren Schicht der Nebennierenrinde, gebildet, wobei die letzten Schritte der Synthese durch das Enzym Aldosteronsynthase katalysiert werden (Ogishima et al. 1992). Die Steuerung der Sekretion erfolgt hauptsächlich durch das RAAS, wobei die Freisetzung von Aldosteron durch Angiotensin II stimuliert wird (Lieberman et al. 1984; Boon et al. 1997a). Daneben bewirken eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration und eine erniedrigte extrazelluläre Natriumkonzentration, sowie in geringem Maße das Adrenocorticotrope Hormon, eine gesteigerte Sekretion. Eine Hemmung der Aldosteron-Sekretion erfolgt bei einer Erniedrigung der Kaliumkonzentration im Blutplasma und durch das atriale natriuretische Peptid.

Bei der Wirkung von Aldosteron unterscheidet man einen frühen nicht-genomischen Effekt und einen späten genomischen Effekt. So tritt ein früher Effekt schon innerhalb einer halben Stunde ein und ist mit einer Steigerung der Aktivität von Natriumkanälen (ENaC) verbunden (Chen et al. 1999, Náráy-Fejes-Tóth und Fejes-Tóth 2000; Le Moëllie et al. 2004). Eine genomische Wirkung wird über den intrazellulär liegenden Mineralokortikoid Rezeptor vermittelt. Über die Bindung von Aldosteron an diesen Rezeptor erfolgt eine Komplexbildung, die im Zellkern als Transkriptionsfaktor dient. Dadurch bewirkt es in den Verbindungstubuli und Sammelrohren der Nieren einen vermehrten Einbau von Natrium- (ENaC) und Kaliumkanälen (ROMK), sowie der Natrium-Kalium-ATPase (Wald 1999). Über diese Ionenkanäle und den Ionenaustauscher wird ein vermehrter Transport von Natrium aus dem Tubulus über das Epithel ins Interstitium erreicht. Durch den osmotischen Gradienten kommt es zu einer gesteigerten Wasserrückresorption, was folglich zu einem Anstieg des Plasmavolumens und letztendlich einem Anstieg des Blutdrucks führt.

1.1.4 Aldosteronsynthese

Die Aldosteronsynthese (CYP11B2) gehört zur Gruppe der Cytochrom P450 Enzyme und ist eine mischfunktionelle Oxygenase. Es ist ausschließlich in der Zona Glomerulosa der Nebennierenrinde lokalisiert, genauer gesagt in der inneren Mitochondrienmembran der Zellen (Ohnishi et al. 1988; Yabu et al. 1991).

Ausgehend von Cholesterol erfolgt durch zwei Cytochrome P450 und einer Hydroxysteroid-Dehydrogenase die Biosynthese von 11-Deoxycorticosteron, welches in drei weiteren Schritten katalysiert durch die Aldosteronsynthese zu Aldosteron umgewandelt wird (Curnow et al. 1991; White et al. 1992; Boon et al. 1997b).

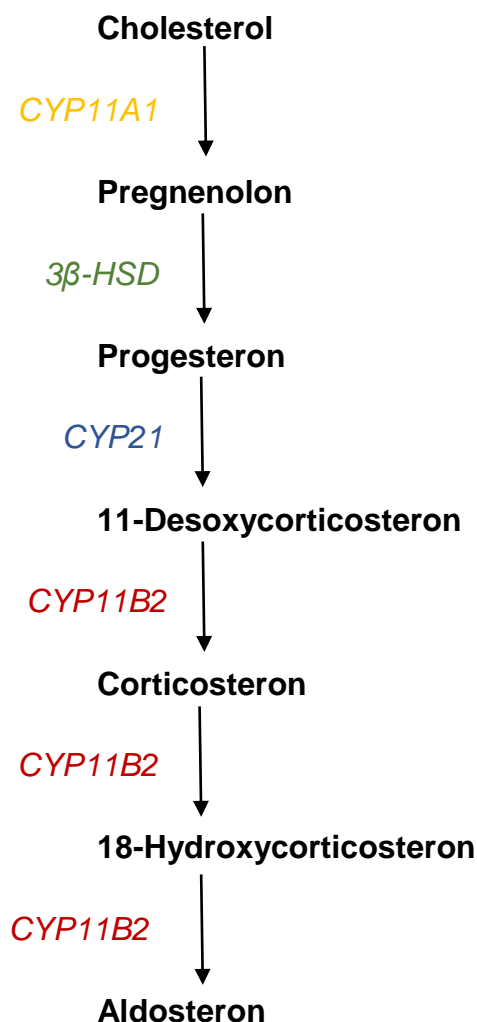


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Biosynthese von Aldosteron

1.2 Connexine und Gap junctions

1.2.1 Aufbau und Funktion von Gap junctions

Als Gap junctions werden porenbildende Zell-Zell-Verbindungen bezeichnet, die einen Austausch von zytosolischen Molekülen, wie Ionen, second messenger und kleinen Metaboliten zwischen benachbarten Zellen ermöglichen (Bruzzone et al. 1996). Ansammlungen mehrerer dieser Zell-Zell-Kanäle werden auch Plaques genannt, wobei sich diese durch eine Annäherung zweier aneinanderliegender Zellmembranen auf 2-5 nm auszeichnen (Revel und Karnovsky 1967).

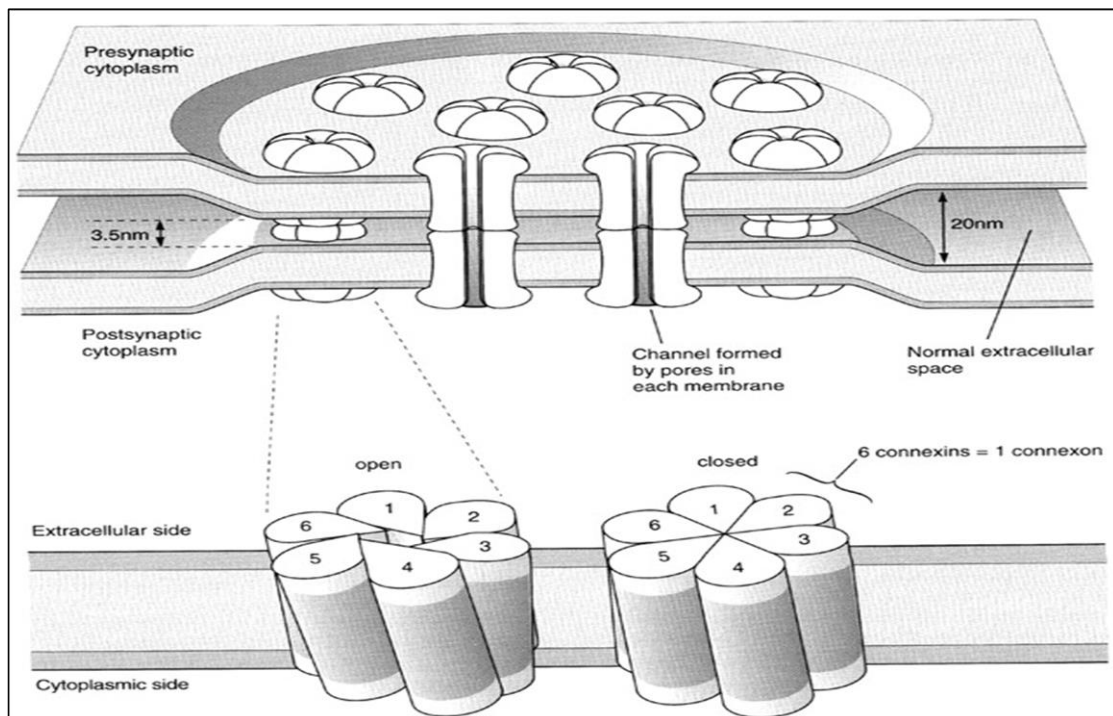


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung eines Gap junction Plaques und schematische Darstellung der Struktur eines Gap junction Kanals in offenem und geschlossenem Zustand; Abbildung teilweise verändert aus (Söhl und Willecke 2004).

Ein Kanal einer Gap junction setzt sich jeweils aus zwei Halbkanälen, Connexone genannt, zusammen. Dabei besteht jedes Connexon aus sechs Connexin-Untereinheiten (siehe Abb 1.3), die sich in Form einer hexameren Rosette zusammenlagern (Cascio et al. 1995). Zwei sich gegenüberliegende

Connexone bilden einen Gap junction Kanal (siehe Abb 1.4 B), wobei es durch die Zusammenlagerung zu einem gegen den Extrazellulärraum abgeschlossenen interzellulären Kanal kommt (Dahl et al. 1992). Über eine Änderung der Konfiguration der einzelnen Connexine zueinander ist eine Öffnung oder ein Verschluss des Kanals möglich (siehe Abb 1.3). Ein Halbkanal kann homomer aus sechs identischen oder heteromer aus unterschiedlichen Connexinen zusammengesetzt sein. Dabei kann ein Gap junction Kanal homotypisch aus zwei identischen Connexonen oder heterotypisch aus zwei unterschiedlichen Connexonen aufgebaut sein (Kumar und Gilula 1996). Hieraus ergibt sich eine Vielzahl möglicher Zusammensetzungen von Gap junctions und somit auch verschiedener Eigenschaften bezüglich des Stoffaustausches. So können je nach Aufbau der beteiligten Connexine, solche heterotypischen Kanäle einen asymmetrischen Stoffaustausch ermöglichen und Diffusion nur in eine Richtung ermöglichen. Dabei ist ein Durchtritt von Molekülen bis zu einem Durchmesser von 1,5 nm und einem Molekulargewicht von 1 kDa möglich (Pitts und Simms 1977; Simpson et al. 1977).

1.2.2 Connexine

Bisher konnten 20 Connexine im Genom der Maus sowie 21 Connexine im humanen Erbgut identifiziert werden. Jedes Connexin-Protein besteht aus vier α -helikalen transmembranären Domänen, zwei extrazellulären und einer zytoplasmatischen Schleife, sowie einem N- und C-Terminus der sich intrazellulär befindet (siehe Abb 1.4. A).

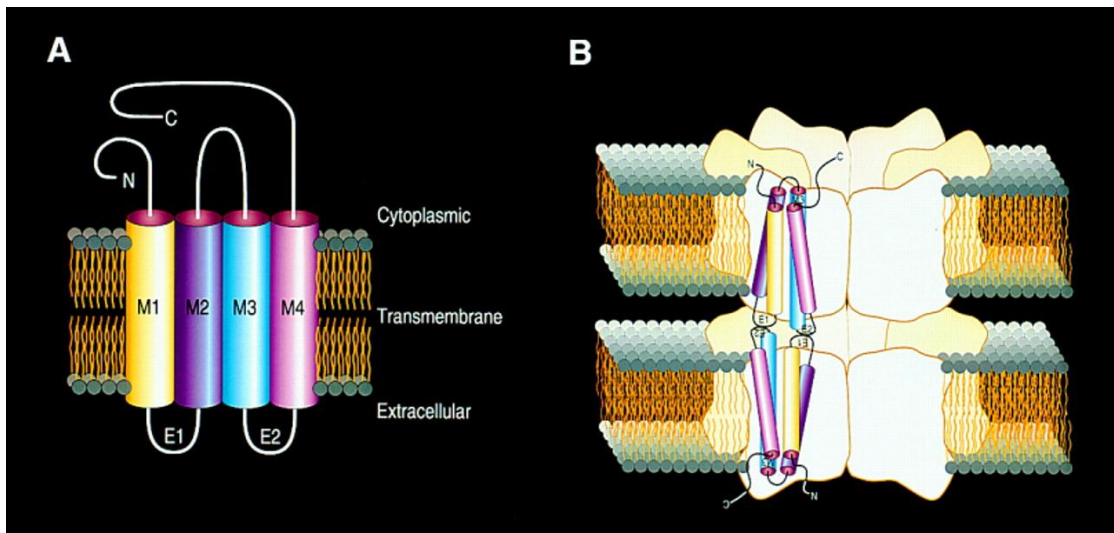


Abb 1.4: A) Schematische Darstellung des Aufbau eines Connexin-Protein. B) Schematische Darstellung eines Vollkanals einer Gap junction; Abbildung aus (Kumar und Gilula 1996).

Die Nomenklatur der Connexine erfolgt nach deren Ursprungsorganismus sowie ihres Molekulargewichts. Dieses System wurde von *Beyer et al* 1987 eingeführt. Connexin wird durch Cx abgekürzt und die nachfolgende Zahl gibt das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa) an. Es gibt Connexine, die ausschließlich beim Menschen existieren und welche, die nur bei der Maus vorhanden sind. Dabei werden die Kleinbuchstaben h für human, bzw. m für mouse vorangestellt, z. B. mCx 26. In den meisten Organen lassen sich verschiedene Connexine nachweisen.

1.2.3 Connexine im juxtaglomerulären Apparat

Die direkte Zell-Zell-Verbindung durch Gap junctions spielt eine wesentliche Rolle für die Funktion vieler Gewebe. So wie in den meisten Organen lassen sich auch im juxtaglomerulären Apparat verschiedene Connexine nebeneinander nachweisen. Dabei stehen über Gap junctions die unterschiedlichen Zelltypen untereinander in Verbindung und sind an der Bildung eines funktionellen Zellverbandes beteiligt. Dabei scheinen die Verbindung reninbildender juxtaglomerulärer Zellen untereinander, als auch mit extraglomerulären Mesangium-, Endothel- und glatten Muskelzellen eine entscheidende Funktion hinsichtlich der Verteilung und Kontrolle reninbildender Zellen zu spielen.

In der Nierenentwicklung zeigen sich dabei Unterschiede beim Vorhandensein verschiedener Connexine in den juxtaglomerulären Zellen. So wurde während der Nierenentwicklung zeitgleich mit dem Auftreten von reninbildenden Zellen Cx40 und in geringerem Umfang Cx45 gefunden, weitere Connexine konnten nicht nachgewiesen werden (Kurtz et al. 2009).

In den Reninzellen der größeren Arteriolen in der Fetalzeit wurde nur Cx40 gefunden. Ebenso lässt sich in den Reninzellen, die durch Transformation während retrograder Rekrutierung entstehen nur Cx40 nachweisen (Kurtz et al. 2009).

Im adulten Organismus werden in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates die Connexin-Proteine Cx37, Cx40, Cx43 und Cx45 exprimiert (Arensbaek et al. 2001; Zhang und Hill 2005; Takenaka et al. 2008; Hanner et al. 2008). Vorangig ist dabei die Expression von Cx40. Dies spiegelt sich auch in der Bedeutung für reninbildenden Zellen wider was in vielen Untersuchungen gezeigt wurde.

Bei Cx40 Knockout-Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass diese Gap junctions für die korrekte Lokalisation der Reninzellen unentbehrlich sind. Die physiologischerweise in juxtaglomerulärer Position befindlichen Reninzellen fanden sich bei Abwesenheit von Cx40 im peri- und juxtaglomerulären Interstitium. Auffällig war neben der inkorrekten Position auch das Fehlen reninbildender Zellen in der Gefäßwand der afferenten Arteriolen (Kurtz et al. 2007). Die Mechanismen, wie die Gap junctions zur Beschränkung der

Reninzellen auf die juxtaglomerulären Position beitragen, sind noch weitgehend unbekannt. Zudem zeigte sich auch eine Einschränkung der Funktion der Zellen und dass die Reninsekretion von Cx40 abhängig ist, da bei homozygoten Cx40 Knockout Mäusen eine veränderte Produktion und Freisetzung von Renin nachgewiesen wurde. So kam es bei einer Erhöhung des Perfusionsdrucks zu einer Erhöhung der Reninsekretion, anstatt zu einer physiologischen Abnahme. (Krattinger et al. 2007; Wagner et al. 2007).

Auch für Cx43 konnte eine Relevanz für Reninzellen belegt werden. Bei Mäusen, bei denen die kodierende Region von Cx43 durch Cx32, welches nicht in juxtamedullären Zellen vorkommt, ersetzt wurde, kam es zu einer deutlichen Verminderung der Expression und Sekretion von Renin (Haeffliger et al. 2006).

Verzichtbar für die Funktion der juxtaglomerulären Zellen scheint Cx37 zu sein. Bei Versuchen mit homozygoten Cx37-Knockout-Mäusen fand sich eine normale Entwicklung und Funktion von Renin-produzierenden Zellen und es war kein Einfluß auf die Regulation der Reninsekretion nachweisbar (Wagner et al. 2009).

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Die Lokalisation und Anzahl der reninbildenden Zellen ist in der Mausnieren in ihrer Entwicklung in einem ständigen Wandel. Auch nach der Ausreifung mit etwa 4 Wochen postnatal ist das RAAS kein starres System sondern passt sich veränderten Bedingungen mit einer Zu- oder Abnahme der reninbildenden Zellen an.

Kommt es zu einer längeren Stimulation des RAAS, geht dies mit einer Zunahme der reninbildenden Zellen einher. Dieser Zuwachs der reninbildenden Zellen geschieht physiologisch im Sinne einer retrograden Rekrutierung, bei der Gefäßmuskelzellen in den afferenten Arteriolen transformieren und die Aufgabe der Reninbildung übernehmen (Cantin et al. 1977). Dieser Vorgang ist umkehrbar. So nimmt bei Suppression bzw. Normalisierung des RAAS die Zahl der reninproduzierenden Zellen wieder ab. Hierbei kommt es nicht zu einer Apoptose von Zellen sondern es erfolgt die Rücktransformation in Gefäßmuskelzellen.

Ein entscheidender Faktor für die physiologische Lage der reninproduzierenden Zellen in den präglomerulären Gefäßen ist das Transmembranprotein Connexin 40 (Cx 40). Es konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass es bei einem Verlust von Connexin 40 zu einem atypischen Vorkommen reninbildender Zellen im periglomerulären Interstitium kommt. Zudem bleibt bei Cx40-defizienten Mäusen die retrograde Rekrutierung aus (Kurtz et al. 2007).

Bislang wurde untersucht, welche Veränderungen der Reninexpression aus dem Verlust von Connexin 40 resultieren und auch welche Auswirkung dabei eine länger anhaltende Stimulation des RAAS auf die reninbildenden Zellen hat.

In dieser Arbeit sollen die Auswirkungen auf Anzahl und Lokalisation reninproduzierender Zellen bei der Cx40 defizienten Maus gezeigt werden, bei der das RAAS von Geburt an dauerhaft stimuliert ist. Durch genetische Deletion der Aldosteronsynthase (AS) kann ein sehr starker Reiz auf das RAAS ausgeübt werden und bewirkt eine kompensatorische Erhöhung der

Anzahl reninproduzierender Zellen im Bereich des juxtaglomerulären Apparates (Makhanova et al. 2006a).

Darüber hinaus soll in dieser Arbeit die altersabhängige Entwicklung des RAAS bei Aldosteronsynthase-Connexin 40-Doppel-Knockout-Mäusen (AS-Cx40-/-Mäuse) untersucht werden. Hierbei soll gezeigt werden, ob es zu einer Veränderung von Anzahl und Lokalisation der reninbildenden Zellen in verschiedenen Alterstadien kommt.

Dafür werden Serienschnitte von Nieren von Wildtyp-Mäusen und Doppel-Knockout-Mäusen verschiedener Altersstadien von 4 bis 46 Wochen angefertigt. Anschließend wird Renin und α -Glattmuskelaktin zur Darstellung des arteriellen Gefäßsystems und der reninbildenden Zellen immunhistochemisch angefärbt. So können histologische Aufnahmen zur zweidimensionalen Auswertung benutzt werden.

Des weiteren werden von diesen Serienschnitten mit Hilfe des Computerprogrammes Amira jeweils ein Gefäßbaumabschnitt dreidimensional rekonstruiert, womit eine Auswertung der räumlichen Reninexpression möglich ist.

Über eine Bestimmung der Renin mRNA kann eine Quantifizierung der Reninveränderung der verschiedenen Altersstadien untereinander und im Vergleich zum Wildtyp erfolgen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Geräte		Hersteller
Autoklav		112, KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
Computer		Precision 690, Dell, Frankfurt am Main
Eismaschine		Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
Filtersets:		
Cy2-Filter:		Filter set 38 HE, Zeiss, Jena
Anregung	450-490nm	
Emission	500-550nm	
TRITC-Filter:		Filterset 43, Zeiss, Jena
Anregung	533-558nm	
Emission	570-640nm	
Fluoreszenzlampe		X-Cite 120, EXFO Life Sciences Industrial Division, Mississauga, Canada
Grafikkarte		Quadro FX 4500, NVIDIA, Wurselen
Homogenisator		Ultra-Turrax T25, Janke und Kunkel, Staufen
Inkubationsschrank		Modell B6200, Heraeus, Hanau
Kühl- und Gefrierschränke		Santo Kühlschrank, AEG, Nürnberg Comfortplus Gefrierschrank, Liebherr, Ochsenhausen Ultra-low-freezer -85°C, New Brunswick Scientific
Kamera		AxioCam MRm, Zeiss, Jena
Magnetrührer		MR 80, Heidolph, Schwabach
Mikroskope		Axiostar 1122-100, Zeiss, Jena Axiovert 200M, Zeiss, Jena
Mikrotom		Rotationsmikrotom RM2165, Leica, Wetzlar
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage		Millipore, Schwalbach

Geräte	Hersteller
PCR- Geräte	Labcycler, Sensquest, Göttingen
pH-Meter	Digital pH-Meter, Knick, Berlin
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000 Gilson, Middleton, USA
Scantisch	Motorisierter Märzhäusertisch (MAC 5000 Controller) Ludl Electronic Products, München
Schüttler	SM25, Edmund Bühler, Hechingen
Spannungsquellen	LKB ECPS 3000/150, Pharmacia, Ratingen LKB GPS 200/400, Pharmacia, Ratingen Multidrive XL, Pharmacia Ratingen
UV-Spektrometer	Biophotometer plus, Eppendorf, Hamburg
Vortexgeräte	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York USA REAX1, Heidolph, Schwabach
Waagen	Analysewaage H-20T, Mettler, Gießen Feinwaage P-1210, Mettler, Gießen Feinwaage W13, Mettler, Gießen
Wärmeblöcke	Thermostat 5320, Eppendorf, Hamburg Thermostat 5436, Eppendorf, Hamburg
Wärmeplatte	HI 1220, Leica, Wetzlar
Wärmeschrank	Modell 300, Memmert, Schwabach
Wärmetopf	PSI, HOT POT 1.411.80/1
Wasserbäder	Modell W 13, Haake, Karlsruhe 1083, GFL, Burgwedel
Zentrifuge	Zentrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Auslaufpipetten 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	Labonord Mönchengladbach
Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebe-Einbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach
Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Light Cycler 480 Multiwell Platten 96	Roche, Mannheim
Liquid Blocker	Labonord, Mönchengladbach
Objektträger, Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Greenwich, USA
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Präparatekästen	Roth, Karlsruhe
Reagiergefäße Eppendorf 0,2ml, 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße Falcon 15ml, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe
Skalpellklingen	Feather, Köln

2.1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits

Produkt	Hersteller
Agarose	Peqlab, Erlangen
Chloroform	Merk, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Neu-Ulm
DNA Längenstandard: 100bp DNA Ladder	Thermo Scientific, Bremen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
First Strand Buffer, 5x	Invitrogen, Karlsruhe
Glycergel Mounting Medium	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
GoTaq DNA Polymerase, 5 U/μl	Promega, Mannheim
GoTaq Reaction Buffer Green	Promega, Mannheim
HCl 1N	Merck, Darmstadt
Heparin Liquemin®2500 5ml Ampullen (5000 I.E./ml)	Roche, Mannheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isotone NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun, Melsungen
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	Merck, Darmstadt
KH ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
Ketamin	CP-Pharma, Burgdorf
Methanol	Merck, Darmstadt
M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/μl	Promega, Mannheim
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaOH 1N	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt

Produkt	Hersteller
Nuclease freies Wasser	Promega, Mannheim
Oligo (dT)15 Primer, 0,5 µg/µl	Promega, Mannheim
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
PCR Nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10mM)	Promega, Freiburg
Paraplast-Plus Paraffin	Sherwood, St. Louis, USA
Pferdeserum (Horse Serum)	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Roti® -Safe GelStain	Roth, Karlsruhe
SYBR® Green PCR Kit	Roche, Mannheim
TRIzol®-Reagenz	GibcoBRL, Eggenstein
Xylazin	Ratiopharm, Ulm
Xylol	Merck, Darmstadt

2.1.4 Primer

Die Primer für die Genotypisierung wurden von der Firma Biomers.net in angeforderter Nukleotidabfolge synthetisiert und gefriergetrocknet geliefert. Durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser wurde eine Konzentration von 10 pmol/µl erreicht.

2.1.5 Antikörper

Primärantikörper	Klonalität	Hersteller	Verdünnung
Chicken-Anti-Renin-IgG	polyklonal	Davids Biotech, Regensburg	1:400
Mouse-Anti-Glattnuskelaktin-IgG	polyklonal	Immunotech, Marseille, Frankreich	1:400

Sekundärkörper	Konjugation	Hersteller	Verdünnung
Donkey Anti-Chicken-IgY	Rhodamin- (TRITC)	Dianova, Hamburg	1:400
Donkey Anti-Mouse-IgG	Cy2	Dianova, Hamburg	1:400

2.1.6 Lösungen und Puffer

Sofern nicht anders beschrieben, wurden Chemikalien für sämtliche Lösungen und Puffer in H₂O bidest gelöst.

Immunhistochemie

Fixierlösung zur Perfusion

3 % Paraformaldehyd (w/v) in PBS

PBS(Phosphate Buffered Saline)-Puffer, pH 7,4
--

NaCl	136 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	10,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

PBS-Otto-Puffer, pH 7,4

KH ₂ PO ₄ x 3 H ₂ O	10 mM
NaCl	140 mM
KH ₂ PO ₄	10 mM

Waschpuffer

BSA 1 % (w/v) in PBS-Otto-Puffer

Blockierlösung		
PBS-Otto-Puffer		
HS		10 % (v/v)
BSA		1 % (w/v)

Molekularbiologie

Agarosegel		
Tris-Acetat-EDTA		
Agarose		1,5% (w/v)

NaOH für gDNA-Extraktion		
NaOH		25 mM

Tris HCl für gDNA-Extraktion		
Tris HCl		1 M, pH 8

10x TAE(Tris-Acetat-EDTA)-Puffer		
Tris Base		0,4 M
Essigsäure		0,2 M
EDTA		10 mM

DEPC-H₂O		
0,1 % DEPC in H ₂ O		
schütteln, über Nacht geöffnet unter Abzug stehen lassen, dann autoklavieren		

2.1.7 Software und Internetdienste

Diese Arbeit wurde mit *Microsoft Office 2013* geschrieben. Die Mikroskopie wurde mit *Axio Vision 4.7* von Zeiss durchgeführt. Die Bilder wurden mit *Adobe Photoshop CS5* und *Image J* (Wayne Rasband, NIH, USA) bearbeitet. Die 3D-Rekonstruktionen wurden mit *Amira 5.4.1* Visualization Software (Mercury Computer System, Inc., USA) erstellt. Die Graphen wurden mit *GraphPad Prism5* angefertigt. Zur Literaturrecherche diente *PubMed* von NCBI-The National Center for Biotechnology. Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

2.1.8 Statistik

Bei statistischen Vergleichen mehrerer unterschiedlicher Gruppen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgender Bonferroni-Reduktion angewendet. Bei Einzelvergleichen wurde der t-Test verwendet. Als statistisch signifikant wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit p bei $p < 0,05$ betrachtet.

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Für die vorliegende Arbeit wurden vier bis sechsundvierzig Wochen alte Mäuse verwendet, bei denen ein Defizit für das Enzym Aldosteronsynthase und für das Protein Connexin 40 vorlag. Hierfür wurden Aldosteronsynthase-defiziente Mäuse mit Connexin 40-defizienten Mäusen (ursprünglich generiert von Kirchhoff et al., 1998) miteinander verpaart. Alle Versuchstiere wurden gemäß den geltenden Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes behandelt. Die Mäuse wurden artgerecht in einem 12h-Tag-Nacht-Rhythmus und bei Raumtemperatur gehalten. Freier Zugang zu Wasser und Futter war stets gewährleistet.

2.2.2 Histologische Methoden

2.2.2.1 Fixierung des Nierengewebes und Organentnahme

Zur Konservierung der Nieren wurden diese vor Entnahme fixiert, indem sie mit Paraformaldehydlösung perfundiert wurden. Dadurch werden autokatalytische Prozesse verhindert und das Gewebe in seinem natürlichen Zustand erhalten. Durch die Fixierung erreicht man auch eine gewisse Härtung des Gewebes, was die spätere Anfertigung der sehr dünnen Gewebeschnitte erleichtert. Für die Organentnahme wurden die Mäuse mittels einer Kombination aus Ketamin (80 mg/kg) und Xylazin (12 mg/kg) narkotisiert. Nach Eröffnung des Abdomens und Darstellung der Aorta abdominalis wurde diese kaudal der Abgänge der Aa. renales abgeklemmt. Distal davon wurde ein Perfusionskatheter eingeführt und fixiert. Durch Eröffnung der V. cava inferior wurde ein Druckausgleich für die Perfusionslösung geschaffen. Nach Abnahme der Sperre wurde über den Katheter 10ml Ringerlösung mit 10 IE/ml Heparin retrograd perfundiert. Anschließend erfolgte die Fixierung mit 40ml 3%iger Paraformaldehydlösung in PBS. Nach Entnahme der Nieren wurden diese in 70%igen Methanol bei

4° C gelagert. Nieren die zur Bestimmung der renalen mRNA vorgesehen waren, wurden nicht perfundiert. Sie wurden nach Ligatur der A. renalis entnommen und in flüssigen Stickstoff bei -80° C bis zur RNA-Bestimmung aufbewahrt.

2.2.2.2 Paraffineinbettung

Für die anschließende Einbettung in Paraffin ist eine vollständige Dehydrierung des Nierengewebes notwendig. Dies erfolgte in speziellen Gewebe-Einbettkassetten schrittweise durch eine Alkoholreihe zunehmender Konzentration:

- 2x in 70% Methanol bei RT für 30 Minuten.
- 2x in 80% Methanol bei RT für 30 Minuten
- 2x in 90% Methanol bei RT für 30 Minuten
- 2x in 100% Methanol bei RT für 30 Minuten
- 1x in 100% Isopropanol bei RT für 30 Minuten
- 1x in 100% Isopropanol bei 45° C für 30 Minuten
- 1x in Isopropanol/Paraffin-Gemisch (1:1) bei 55° C für 30 Minuten

Anschließend wurde das Nierengewebe zwei Mal für jeweils mindestens 24h in geschmolzenem Paraffin im Wärmeschrank bei 60° C inkubiert. Das jetzt vollständig mit flüssigem Paraffin durchtränkte Gewebe wurde dann in mit 60°C warmen Paraffin gefüllten Silikon-Kautschuk-Einbettformen überführt. Bei RT erfolgte die Abkühlung und die damit verbundene Aushärtung der Paraffinblöcke.

2.2.2.2.1 Anfertigung von Paraffinschnittserien und Entparaffinierung

Die ausgehärteten Paraffinblöcke mit den eingebetteten Präparaten wurden auf Holzblöcke geklebt, welche in ein Rotationsmikrotom eingespannt werden konnten. Anschließend wurde mit dem Mikrotom 5 µm dicke Schnitte in Serie, mit jeweils ca. 70-80 Schnitte pro Präparat gefertigt. Um diese zu strecken wurde jeder Schnitt einzeln in ein 40°C warmes Wasserbad überführt. Noch im Wasserbad wurden die Schnitte auf superfrost plus Objektträger aufgezogen und anschließend im Wärmeschrank bei 40°C über Nacht getrocknet.

Die getrockneten Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert und durch eine Alkoholreihe abnehmender Konzentration schrittweise rehydriert:

- 2x in 100% Xylol für je 10 Minuten
- 2x in 100% Isopropanol für je 5 Minuten
- 1x in 96% Isopropanol für 5 Minuten
- 1x in 80% Isopropanol für 5 Minuten
- 1x in 70% Isopropanol für 5 Minuten

2.2.2.3 Immunhistochemische Färbung

In der Immunhistochemie verwendet man spezifische Antikörper um über deren Bindung an Antigene verschiedene Zellstrukturen nachzuweisen. Dazu werden bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung die Gewebeschnitte mit einem unkonjugierten primären Antikörper inkubiert. Dieser bindet an das zu detektierende Antigen der Zelle. Im nächsten Schritt werden die Gewebeschnitte mit einem sekundären, mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Antikörper inkubiert. Dieser bindet an den F_c-Teil des primären Antikörpers. Unter dem Mikroskop wird das Fluorophor dieses Antigen-Antikörper-Komplexes mittels Licht bestimmter Wellenlänge sichtbar.

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde nach folgenden Protokoll durchgeführt:

Färbeprotokoll:

- 3x waschen der Schnitte in PBS-Otto-Puffer auf dem Schüttler für je 5 Minuten
- Absaugen des Puffers und Umranden der Präparate mit Liquid-Blocker-Fettstift
- Auftragen der Blockierlösung zur Abschwächung unspezifischer Bindungen
- Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler für 20 Minuten
Absaugen der Blockierlösung
- Aufbringen der primären Antikörper in Blockierlösung
Mouse-Anti-Glattmuskelaktin-IgG, 1:400
Chicken-Anti-Renin-IgG, 1:400
- Inkubation bei 4°C bis zum nächsten Tag
- 3x waschen der Schnitte in PBS-Otto/1%BSA auf dem Schüttler für je 5 Minuten
- Aufbringen der sekundären Antikörper in Verdünnung mit PBS-Otto/1% BSA
Cy2-konjugierter Donkey-Anti-Mouse-IgG, 1:400
Rhodamin-TRITC -konjugierter Donkey-Anti-Chicken-IgY, 1:400
- Inkubation bei RT im Dunkeln für 90 Minuten

- 3x waschen der Schnitte in PBS-Otto auf dem Schüttler im Dunkeln für je 5 Minuten
- Eindeckeln der Objektträger mit Glycergel

2.2.3 Dreidimensionale Rekonstruktion

2.2.3.1 Bildaufnahme und Digitalisierung

Die mittels sekundärer Antikörper zweifach immunfluoreszent gegen Glattmuskelaktin und Renin gefärbten Serienschritte wurden für die 3D-Rekonstruktion mikroskopiert. Dabei können unter Verwendung verschiedener Fluoreszenzfilter die Fluorophore der Sekundärantikörper für Glattmuskelaktin und Renin dargestellt werden.

Zur Darstellung von Glattmuskelaktin wurde ein Fluoreszenzfilter für Cy2 verwendet, wobei die Fluoreszenz mit einer Wellenlänge von 450-490 nm angeregt und somit bei einer Emission von 500-550nm die Gefäßmuskulatur grün sichtbar wurde. Für Renin wurde ein Rhodamin-(TRITC-)Filter verwendet, der mit einer Wellenlängen von 533-558nm die Fluoreszenz angeregt und somit bei einer Emission von 570-640nm Reninmoleküle sichtbar machte.

Die Bildaufnahme erfolgte dabei mit einem Axiovert 200M Mikroskop mit motorisierter Objektauflage, einer Schwarzweiß-CCD-Kamera (AxioCam MRm) und entsprechenden Fluoreszenzfilter. Zur Digitalisierung diente die Software Axio Vision Rel.4.5. von Zeiss.

Vor der Bildaufnahme mussten die Kanäle für Glattmuskelaktin und Renin erst eingerichtet und Belichtung und Kontrast manuell eingestellt werden. Für die 3D-Rekonstruktionen erfolgten die Aufnahmen mit einer 100fachen Vergrößerung. Hierbei konnten die Nierenausschnitte nicht vollständig abgebildet werden. So wurden mehrere Bilder mit 15% Überlappung angefertigt und anschließend mit der Funktion Sticking zu einem Bild zusammengefügt. Abgespeichert wurden die Bilder im Rot-Grün-Blau (RGB)-Farbraum, wobei für Glattmuskelaktin der grüne und für Renin der rote Farbkanal belegt wurde. Es erfolgte eine für die weitere Bearbeitung notwendige Konvertierung auf 8 Bit unter der Verwendung des Grafikformates TIF.

2.2.3.2 Bildstapelerstellung mit Hilfe von Image J

Für die weitere Bearbeitung der Bilder mit der Rekonstruktionssoftware Amira ist eine gleiche Pixelanzahl pro Bild eine entscheidende Voraussetzung.

Da die einzelnen Bilder der Schnittserien sowohl in Länge als auch Breite unterschiedlich groß waren, wurden diese mit der Grafiksoftware ImageJ bearbeitet. Dazu wurden die einzelnen Bilder zu einem Bildstapel (Stack) zusammengefügt. Als Referenz diente das größte Bild des Stapels. Anschließend wurde bei allen kleineren Bildern ein schwarzer Rahmen angefügt, so dass ein Bildstapel gleich großer Bilder entstand. Dieser Gesamtstapel wurde als Image Sequence gespeichert.

2.2.3.3 3D-Rekonstruktion mittels Amira

2.2.3.3.1 Übertragung der Daten in den dreidimensionalen Raum

Die so gewonnenen Daten der Bildstapel wurden auf einer Grafik-Workstation in die Amira 5.4.1. Visualisation Software übertragen. Zur Skalierung der Daten wurde das Verhältnis von Pixel zu Bildgröße in μm festgelegt. Es handelt sich hierbei um eine Größe die von der Kamera und dem verwendeten Objektiv abhängig ist. Bei der Verwendung des Objektivs mit 10-facher Vergrößerung entspricht 1 Pixel einer Bildgröße von $1 \times 1 \mu\text{m}$. Für die Rekonstruktion im dreidimensionalen Raum wurde eine Boundingbox definiert, mit der sich die Abmessung der Bildstapel in Länge, Breite und Tiefe (Schnittdicke mal Anzahl der Schnitte) und somit die Abmessung des Datensatzes im Raum beschreiben lässt. Da Pixel nur die zweidimensionale Ausdehnung beschreibt, wurde für die dreidimensionale Ausdehnung der Begriff Voxel eingeführt. Da die Dicke der Serienschnitte $5 \mu\text{m}$ betrug, misst ein Voxel somit $1 \times 1 \times 5 \mu\text{m}$.

2.2.3.3.2 Separierung der Farbkanäle

Die im RGB-Farbraum abgespeicherten Bilder wurden mit der Split-Funktion von Amira wieder in die einzelnen Kanäle separiert. Dabei konnte der blaue Farbkanal gelöscht werden, da hier keine Daten gespeichert waren. Der grüne Farbkanal enthielt die Daten der Glattnuskelaktin-Bilder, der rote Farbkanal die Daten der Renin-Bilder. Anhand dieser nun monochromen Kanäle, welcher die durch die Fluoreszenzmarkierung entstandenen Grauwerte enthielten, konnte eine separate Datensegmentierung mit Amira durchgeführt werden.

2.2.3.3.3 Alignierung

Für eine exakte Rekonstruktion der Niere war eine weitgehende Deckungsgleichheit der Serienschritte notwendig. Dies wurde durch eine Alignierung erreicht, bei der die jeweils aufeinanderfolgenden Schnitte zur Deckung gebracht wurden. Erst wurde dies am Aktinbildstapel durchgeführt, da hier aufgrund der deutlich höheren Anzahl von Immunreaktionen eine Alignierung einfacher durchzuführen ist. Nachdem dies erst automatisch durchgeführt wurde, musste dieser Schritt anschließend Schnitt für Schnitt kontrolliert und gegebenenfalls manuell nachgebessert werden. Dies wurde dann auch mit dem Reninbildstapel durchgeführt, wobei man hier den schon fertigen Aktinbildstapel als Referenz benutzte.

2.2.3.3.4 Datensegmentierung

Bei der Segmentierung (Labelling) der Daten werden die durch die Immunreaktion sichtbar gewordenen Signale markiert. Anhand dessen konnte man später die jeweilige Oberfläche der Struktur berechnen. Signale, welche markiert waren, werden dabei Labels genannt, die kompletten Fluoreszenzsignale eines Bildstapels werden Labelfield genannt. Zur Durchführung des Labelns stand eine Vielzahl von Programmfunktionen zur Verfügung. Bei der *Magic Wand* nutzt man die verschiedenen Abstufungen der Grauwerte (0-255, schwarz/weiß). Dabei werden durch das Einstellen eines Graubereiches alle entsprechenden Signale die mit einem ausgewählten Voxel in Verbindung stehen, markiert. *Threshold* nutzt das gleiche Prinzip, wobei hier jedoch der komplette Schnitt bearbeitet wird. Mit *Brush* können Strukturen manuell markiert werden, während mit *Fill Holes* Löcher in Materialien aufgefüllt werden. War ein Schnitt nicht vollständig oder fehlte komplett, hatte man mit *Interpolate* die Möglichkeit ein Signal zwischen zwei Schnitten zu ergänzen. Artefakte konnten mit *Remove Islands* automatisch entfernt werden. Die Funktion *Smooth Labels* diente zur Glättung von zu kantig erscheinenden Oberflächen. War die Segmentierung abgeschlossen, konnte man mittels des Aktin-Labelfields die Blutgefäße darstellen. Aus dem Renin-Labelfield wurde die Anzahl und Verteilung der reninpositiven Zellen generiert. Zur Darstellung der Glomeruli und der Kapsel machte man sich deren Eigenfluoreszenz zu Nutze, anhand derer die entsprechenden Labelfields erstellt werden konnten.

2.2.3.3.5 Oberflächengenerierung

Anhand dieser für jede Färbung erstellten Labelfields konnte mit der Funktion *Surface Gen* die jeweilige Oberfläche berechnet und mit *Surface View* dreidimensional dargestellt werden. Es bestand die Möglichkeit diese 3D-Modelle mit verschiedenen Programmfunktionen zu bearbeiten. So wurde mit *Simplifier* eine Reduktion der Datenmenge erreicht, indem man die Anzahl der oberflächendarstellenden Polygone verringerte. Dadurch konnte die Geschwindigkeit der Darstellung optimiert werden. Mit der Funktion *Smooth Surface* konnte die Oberfläche geglättet werden, mit *Surface Editor* war es möglich, überflüssige Abschnitte der Rekonstruktion zu entfernen. Bei den Modellen hatte man die Möglichkeit die einzelnen Materialien separat oder gemeinsam darzustellen. Auch war eine transparente Darstellung und Betrachtung einzelner Materialien möglich. Die 3D-Modelle konnten nun für die Auswertung rotiert und räumlich analysiert werden.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Genotypisierung

Zur Feststellung des Genotyps der für diese Arbeit verwendeten Tiere wurden die PCR-Analyse verwendet. Dabei wurde die genomische DNA mittels NaOH-Methode aus dem Schwanz der Maus extrahiert.

Dafür wurde eine ca. 2mm große Schwanzbiopsie entnommen. Diese inkubierte man mit 100 µl 25mM NaOH im Schüttler bei 96° C für 1h. Danach durchmischte man die Probe gründlich im Vortexer und es erfolgte die Zugabe von 10 µl 1 M TrisHCL (pH 8). Dieses Gemisch zentrifugierte man dann für 6 Minuten bei 10000 rpm. Der gewonnene Überstand enthielt die genomische DNA welche dann mittels PCR amplifiziert wurde.

Anschließend wurden die PCR-Ansätze auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese bei 120 V entsprechend ihrer Bandenlänge aufgetrennt.

In dieser Arbeit wurde der Nachweis der codierenden Regionen für Aldosteronsynthase und Connexin 40 nach folgendem Reaktionsansatz und Amplifizierungsprotokoll überprüft.

2.2.4.1.1 Genotypisierung Aldosteronsynthase

Verwendete Primer Aldosteronsynthase

Name	Sequenz
Aldosynth-For	5'-acc aga gcc caa atg tct ca-3'
Aldosynth-Rev	5'-ctg atg cat ctc cag gtg ta-3'
EGFP-Rev	5'-ctg aac ttg tgg ccg ttt ac-3'

PCR Reaktionsansatz Aldosteronsynthase

20 µl PCR- Reaktionsansatz	
Primer (AS for.; 10pmol/µl)	1,0 µl
Primer (AS rev.; 10pmol/µl)	1,0 µl
Primer (eGFP; 10 pmol/µl)	1,0 µl
dNTPs (2,5 mM)	2,5 µl
Puffer (GoTaq buffer green)	4,0 µl
GoTaq-DNA-Polymerase	0,3 µl
ddH ₂ O	8,2 µl
gDNA	2,0 µl
20 µl	

Amplifizierungsprotokoll Aldosteronsynthase

Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	93° C	2 Min	Aufschmelzen
35	93°C	30 Sek	Aufschmelzen
35	62° C	30 Sek	Annealing
35	72° C	2 Min	Elongation
1	72°C	7 Min	Elongation
1	15° C	∞	Lagerung

Bandenlänge Aldosteronsynthase

Wildtyp-Allel: 330 bp

Knockout-Allel: 210 bp

2.2.4.1.2 Genotypisierung Connexin 40

Verwendete Primer Cx40

Name	Sequenz
Cx40 WT sense 314bp	5'-ggg aga tga gca ggc cga ctt ccg gtg cg-3'
Cx40 WT antisense 314bp	5'-gta ggg tgc cct gga gga caa tct tcc c-3'
Cx40 sense 494bp	5'-gga tcg gcc att gaa caa gat gga ttg cac-3'
Cx40 antisense 494bp	5'-ctg atg ctc ttc gtc cag atc atc ctg atc g-3'

PCR-Reaktionsansatz Cx40

20µl Ansatz	
Cx40 WT s	1,0 µl
Cx40 WT as	1,0 µl
Cx40 494 s	1,0 µl
Cx40 494 as	1,0 µl
dNTPs	2,5 µl
Taq	0,3 µl
Puffer	4,0 µl
H ₂ O	7,2 µl
gDNA	2,0 µl
20 µl	

Amplifizierungsprotokoll Cx40

Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	94° C	3 Min	Aufschmelzen
35	94° C	1 Min	Aufschmelzen
35	60° C	30 Sek	Annealing
35	72° C	30 Sek	Elongation
1	72° C	5 Min	Elongation
1	8° C	∞	Lagerung

Bandenlänge Connexin 40

Wildtyp-Allel: 314 bp

Knockout-Allel: 494 bp

2.2.4.2 Semi-Quantitative Bestimmung der Reninexpression

2.2.4.2.1 Isolierung von RNA aus Nieren

Zur Isolierung von renaler RNA wurde Trizol-Reagenz verwendet. Dazu wurde nach dem entsprechenden Protokoll des Herstellers vorgegangen. Diese Methode basiert auf dem Guanidinium-Phenol-Chloroform-Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987). Das verwendete Trizol-Reagenz ist eine einphasige Lösung, welche Phenol und Guanidinisothiocyanat enthält. Die Trennung des Homogenats in drei Phasen erfolgte mittels Chloroform. Die darauf folgende Fällung der RNA aus der wässrigen Phase wurde mit Isopropanol durchgeführt.

Bei sämtlichen Arbeitsschritten wurden Latexhandschuhe zur Vermeidung von Kontamination mit RNasen getragen. Es wurden RNase-freie Einmalartikel und Geräte verwendet. Alle benötigten Lösungen und Puffer wurden mit Diethylenpyrocarbonat(DEPC) behandeltem Wasser angesetzt. Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Protokoll zur Isolierung von RNA

- 1 ml TRIzol Reagenz je halbe Mausniere in 12 ml Sarstedt-Tubes auf Eis vorlegen
- Nach Überführen der Niere aus dem flüssigen Stickstoff in das Röhrchen für etwa 30 sek mit Ultra-Turrax-Mixer homogenisieren
- Überführen dieses Mix in 2 ml Eppendorf-Cup und bei Raumtemperatur für 5 Min ruhen lassen (Denaturierung der Proteine, welche sich in Phenol lösen)
- Anschließend 200 µl Chloroform zugeben und schütteln
- Zur Auftrennung des Homogenisats für 20 Min bei 4° C und 12 000 rpm zentrifugieren
- Vom wässrigen Überstand 500 µl in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup überführen, mit 500 µl Isopropanol mischen und gut schütteln
- Für 10 min bei Raumtemperatur ruhen lassen (Ausfällen der RNA)
- Anschließend für 10 min bei 4° C bei 12 000 rpm zentrifugieren

- Überstand verwerfen und das Pellet in 1 ml 75% Ethanol überführen
- Für 5 min bei 4° C bei 7500 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet für 10 min bei Raumtemperatur trocknen lassen
- Anschließend je nach Pelletgröße in RNase-freiem Wasser lösen
- Für maximal 2 min bei 65° C im Schüttler (zur Resuspendierung)
- Bis zur Weiterverwendung Lagerung bei -80°C

Quantifizierung der RNA

Zur Ermittlung der Konzentration der isolierten RNA diente ein Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm.

Die Qualität der isolierten RNA wurde aus dem Quotienten der optischen Dichte beider Wellenlängen bestimmt. Zur Verwendung kam nur RNA mit einem Quotienten zwischen 1,5 und 2,0.

2.2.4.2.2 Synthese von cDNA

Durch reverse Transkription wurde nun aus der gewonnen RNA die dazu komplementäre DNA (cDNA) hergestellt. Dafür wurden Oligo (dT)₁₅-Primer verwendet, die komplementär zum poly(A)-Schwanz der eukaryotischen mRNA sind, um so selektiv die mRNA zu transkribieren.

Die so gewonnene cDNA diente als Matrizen-Strang für die nachfolgende PCR.

Reaktionsansatz	
Ausgangs-RNA	1,0 µg
Oligo(dT) ₁₅ -Primer	0,5 µg/µl
DEPC-H ₂ O	add
10 µl	

Der Reaktionsansatz wurde für 5 min auf 65°C erwärmt und anschließend auf Eis gestellt.

Zugabe von:

Mix	
M-MLV-Reverse Transkriptase (100 U)	1,0 µl
dNTPS (2,5 mM)	4,0 µl
Puffer (5x First Strand Puffer)	4,0 µl
DEPC-H ₂ O	3,0 µl

Die anschließende Synthese der cDNA erfolgte dann für 1h bei 37° C. Zur Inaktivierung der Reserve Transkriptase wurde das Reaktionsgemisch im Anschluss für 2 min auf 96° C erhitzt. Danach wurde die gewonnene cDNA mit 30 µl nukleasefreien Wasser verdünnt und bei -20° C gelagert.

2.2.4.2.3 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Bei der quantitativen Echtzeit-PCR wird nach jedem PCR-Zyklus die entstandene Menge an DNA photometrisch bestimmt. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, der in gebundener Form 1000-fach stärker leuchtet und an die neu gebildete doppelsträngige DNA bindet, gemessen. Somit ist die gemessene Signalintensität proportional zur bei jedem Zyklus neu entstandenen DNA-Menge. Zur Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR wurde das Lightcycler 480 SYBR Green I Masterkit und ein Roche Lightcycler LC480 benutzt.

Verwendete Primer

Name	Sequenz
GAPDH s	5'-atg cca tca ctg cca ccc aga ag-3'
GAPDH as	5'-act tgg cag gtt tct cca ggc gg-3'
Renin s	5'-atg aag ggg gtg tct gtg ggg tc-3'
Renin as	5'-atg cgg gga ggg tgg gca cct g-3'

Reaktionsansatz	
cDNA	1,0 µl
SYBR Green PCR Mastermix	5,0 µl
sense Primer (10pmol/µl)	0,5 µl
antisense Primer (10pmol/µl)	0,5 µl
H ₂ O	3,0 µl
	10 µl

Amplifizierungsprotokoll

Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	94° C	15 Min	Aktivierung
40	95° C	15 s	Denaturierung
40	58° C	20 s	Annealing
40	72° C	20 s	Elongation

Die Fluoreszenzmessung erfolgte am Ende eines jeden Zyklus. Zur Analyse des Schmelzverhaltens der vervielfältigten DNA wurde nach Ablauf des Amplifikationsprogrammes die DNA von 60° C auf 95° C langsam (0,1° C/Sek) erhitzt, hierbei wurde kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Als „Housekeeping Gen“ diente GAPDH zur relativen Bestimmung der Reninexpression.

3. Ergebnisse

3.1 Reninexpressionsmuster der adulten Wildtyp-Maus

Ziel der Untersuchung war es, die Veränderungen der Reninexpression von AS-Cx40-/-Mäusen in verschiedenen Altersstufen zu bestimmen. Hierfür wurden 3D-Rekonstruktionen angefertigt, welche jeweils den Abschnitt eines arcuaten Seitenastes mit den abgehenden Arteriae interlobulares und den afferenten Arteriolen darstellt und die dazugehörigen Glomeruli und die Nierenkapsel sowie die reninbildenden Zellen zeigt. Für die zu untersuchenden Mäuse diente als Referenz die 3D-Rekonstruktion (Abb.3.1.) eines Gefäßbaumabschnittes einer adulten Wildtyp-Maus (10 Wochen alt) und histologische Aufnahmen der jeweiligen Altersstufen

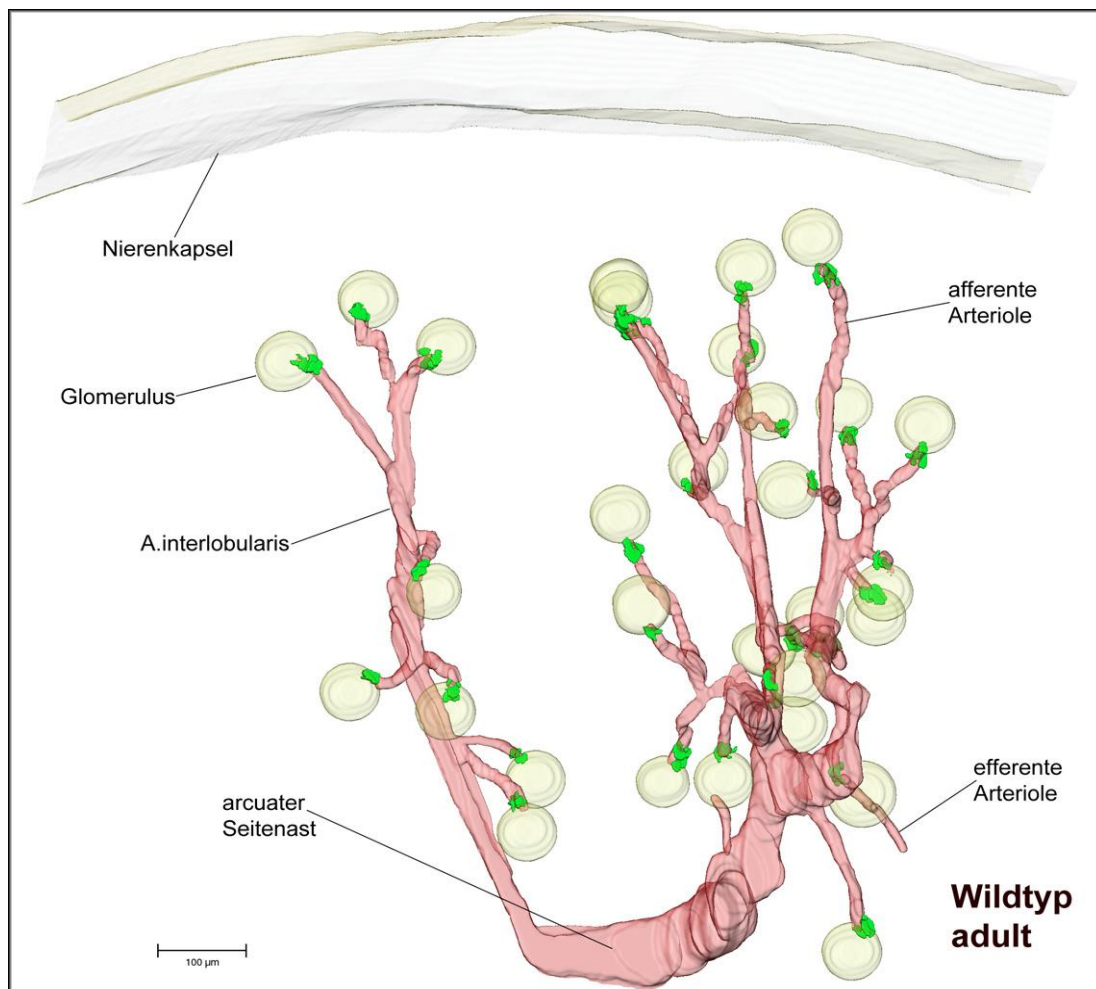


Abb. 3.1: [Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) eines ausgewählten Gefäßbaumabschnittes einer **adulten Wildtyp-Maus** mit dazugehörigen Glomeruli und Kapselausschnitt (gelb).

In dieser Darstellung (Abb. 3.1) ist die Lokalisation reninproduzierender Zellen am terminalen Abschnitt der afferenten Arteriolen in juxtaglomerulärer Position gut zu erkennen. Weiterhin wird deutlich, dass diese an jeder afferenten Arteriole zu finden sind. Der Bereich um die Bowman'schen-Kapsel, die efferente Arteriole und die übrigen Abschnitte des Gefäßbaumes sind frei von reninproduzierenden Zellen.

Anhand der Rekonstruktion lässt sich auch die Menge an reninhaltigen Zellen vergleichen, welche bei der Wildtyp-Maus an jedem Glomerulus etwa gleich groß ist.

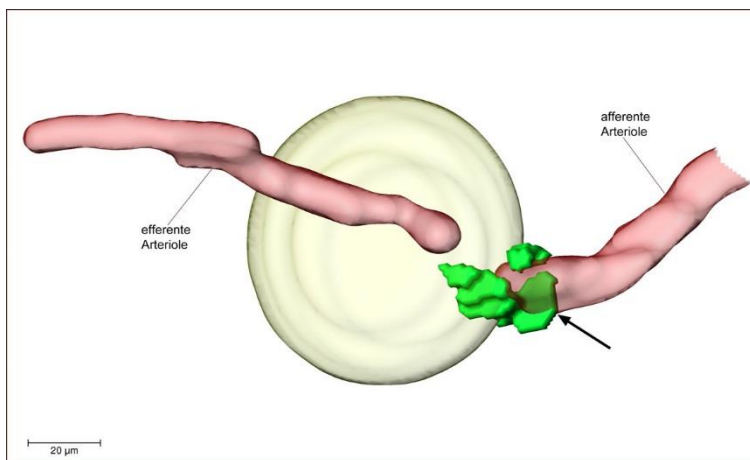


Abb. 3.2: [Detailansicht] 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) einer afferenten und einer efferenten Arteriole und des dazugehörigen Glomerulus einer **adulten Wildtyp-Maus**.

Pfeil: Reninzellen in typischer juxtaglomerulärer Position.

In der Detailaufnahme (Abb. 3.2) wird die typische juxtaglomeruläre Renin-expression am Ende der afferenten Arteriole (siehe Pfeil) noch deutlicher.

3.2 Die 4 Wochen alte Maus

3.2.1 Die 4 Wochen alte Aldosteronsynthase-Connexin 40-Doppel-Knockout-Maus

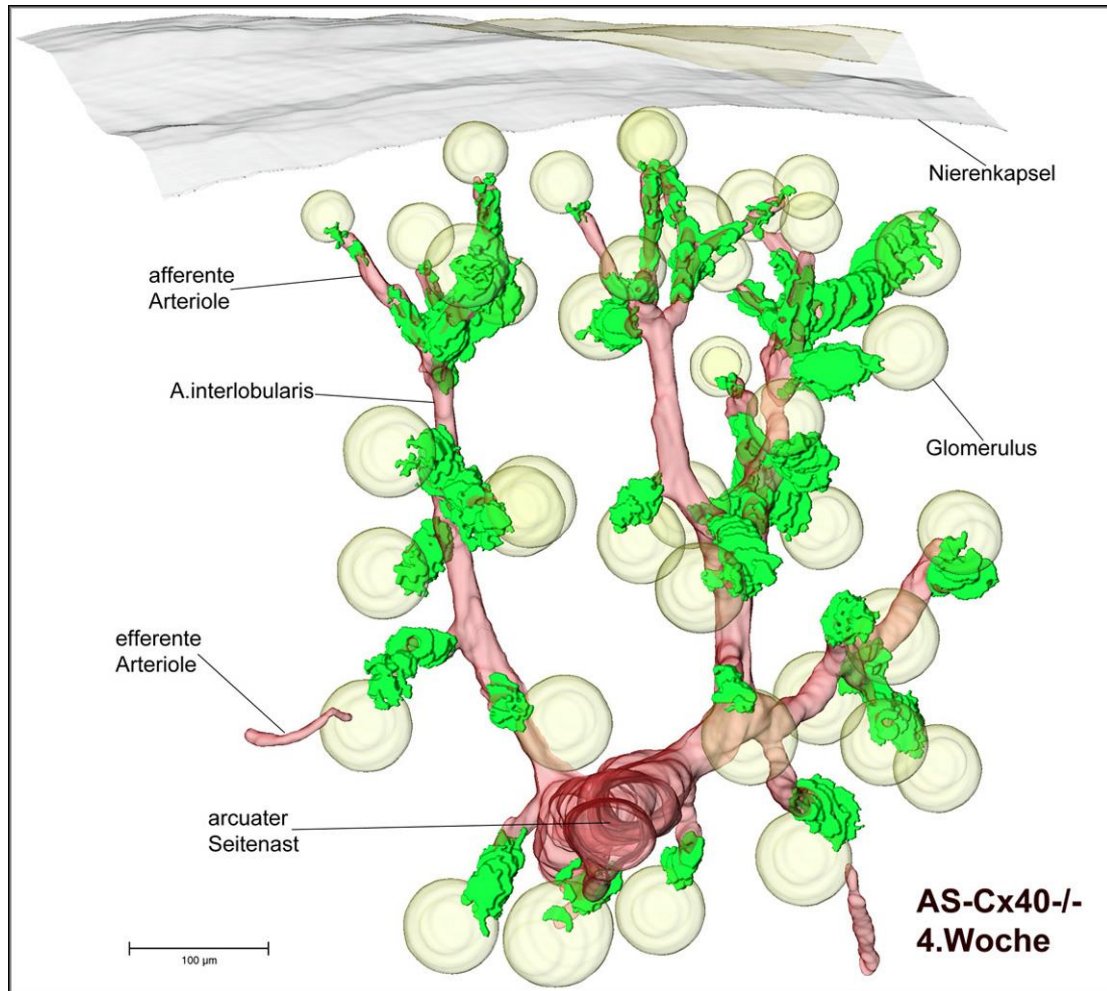


Abb. 3.3: [Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) eines ausgewählten Gefäßbaumabschnittes einer **4 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus** mit dazugehörigen Glomeruli und Kapselausschnitt (gelb).

In der Entwicklung der Niere vollzieht sich eine deutliche Veränderung in der Anzahl und Lokalisation der reninproduzierenden Zellen. Dieser Prozess ist etwa 4 Wochen postpartal abgeschlossen, so dass ab diesem Alter Zahl und Lokalisation bei Wildtyp-Mäusen einen annähernd konstanten Wert haben. Ein wichtiger Faktor für die typische juxtaglomeruläre Position der Reninzellen ist Connexin 40, welches als entscheidendes Protein für die Zell-Zell-Verbindung zwischen den Reninzellen gilt. Bei Aldosteronsynthase-defizienten Mäusen kommt es durch Salz- und damit Wasserverlust zu einer

starken Stimulation des RAAS und folglich zu einer deutlichen Zunahme von Reninzellen.

Im Folgenden soll sowohl Anzahl als auch Lokalisation von reninbildenden Zellen in Aldosteronsynthase-Connexin 40-Doppel-Knockout-Mäusen in unterschiedlichen Altersstadien untersucht werden.

Bei der 4 Wochen alten AS-Cx40^{-/-}-Maus zeigen sich in der 3D-Rekonstruktion (Abb. 3.3) sowohl eine Zunahme als auch eine veränderte Lokalisation der reninproduzierenden Zellen. Diese sind zwar, wie auch bei der adulten Wildtyp-Maus, an allen Glomeruli vorhanden, jedoch nicht mehr auf die typische juxtaglomeruläre Position in der Media der afferenten Arteriole beschränkt. So finden sich reninbildende Zellen überwiegend entlang der afferenten Arteriole, allerdings nicht beschränkt auf die Media, sondern manschettenartig in mehreren Schichten um das Gefäß atypisch lokalisiert. Bei den juxtamedullären afferenten Arteriolen sieht man den Effekt verstärkt. An diesen erkennt man eine deutlich gesteigerte Reninexpression, welche erheblich ausgeprägter ist als an den afferenten Arteriolen superfizieller Glomeruli. Die efferenten Arteriolen, die Aa. Interlobulares, und der arcuate Seitenast sind frei von reninpositiven Zellen.

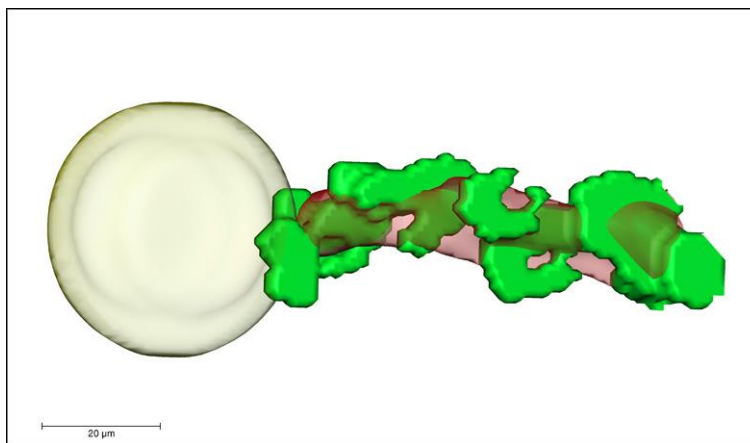


Abb. 3.4: [Detailansicht] 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) einer afferenten Arteriole und des dazugehörigen superfiziellen Glomerulus einer **4 Wochen alten AS-Cx40^{-/-}-Maus.**

In der Detailaufnahme (Abb. 3.4) ist die Reninexpression an einem kapselnahen Glomerulus zu sehen. Es zeigt sich deutlich eine retrograde Rekrutierung von Reninzellen an der afferenten Arteriole, sie sind teilweise der Gefäßwand aufgelagert. In der histologischen Darstellung (Abb. 3.7) ist diese Beobachtung gut zu erkennen.

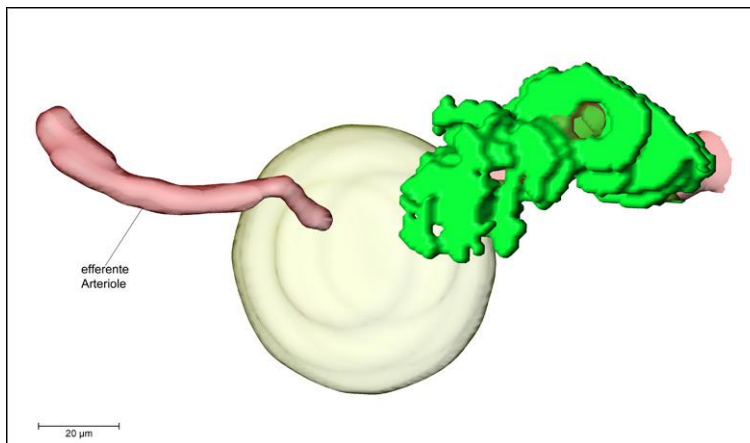


Abb. 3.5: Detailansicht einer afferenten und einer efferenten Arteriole und des dazugehörigen juxtamedullären Glomerulus einer **4 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus**.

Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot) dargestellt.

Bei den juxtamedullären Glomeruli nehmen die reninproduzierenden Zellen, im Vergleich zur Wildtyp-Maus, noch stärker zu. Auch hier sieht man in der Detailaufnahme (Abb. 3.5) eine retrograde Rekrutierung entlang der afferenten Arteriole. Allerdings sind hier die reninbildenden Zellen klar mehrschichtig der Gefäßwand angelagert. Die efferente Arteriole ist frei von reninbildenden Zellen.

In den histologischen Aufnahmen wird die verstärkte Reninexpression in den juxtamedullären Glomeruli noch deutlicher (Abb. 3.6). Hier zeigt sich, dass die Reninzellen nicht mehr auf die Media der Gefäßwand beschränkt sind, sondern auch dieser mehrschichtig aufsitzen (Sterne Abb. 3.6). Während die juxtaglomerulären Reninzellen nahezu ausschließlich Renin exprimieren, ist bei den weiter vom Glomerulus entfernten Reninzellen eine Kolo-kalisation von Renin und Glattmuskelaktin erkennbar, was sich durch Überlagerung der Immunfluoreszenzsignale gelb darstellt (Pfeile Abb. 3.6). Dies ist typisch für die retrograde Rekrutierung von Reninzellen. Auch bei den superfiziellen Glomeruli ist eine retrograde Rekrutierung in den afferenten Arteriolen zu sehen. Hier finden sich aber auch atypische reninbildende Zellen, die den Glattmuskelzellen aussen anliegen (Pfeile Abb. 3.7). Die Reninexpression ist in Kapselnähe insgesamt deutlich weniger ausgeprägt.

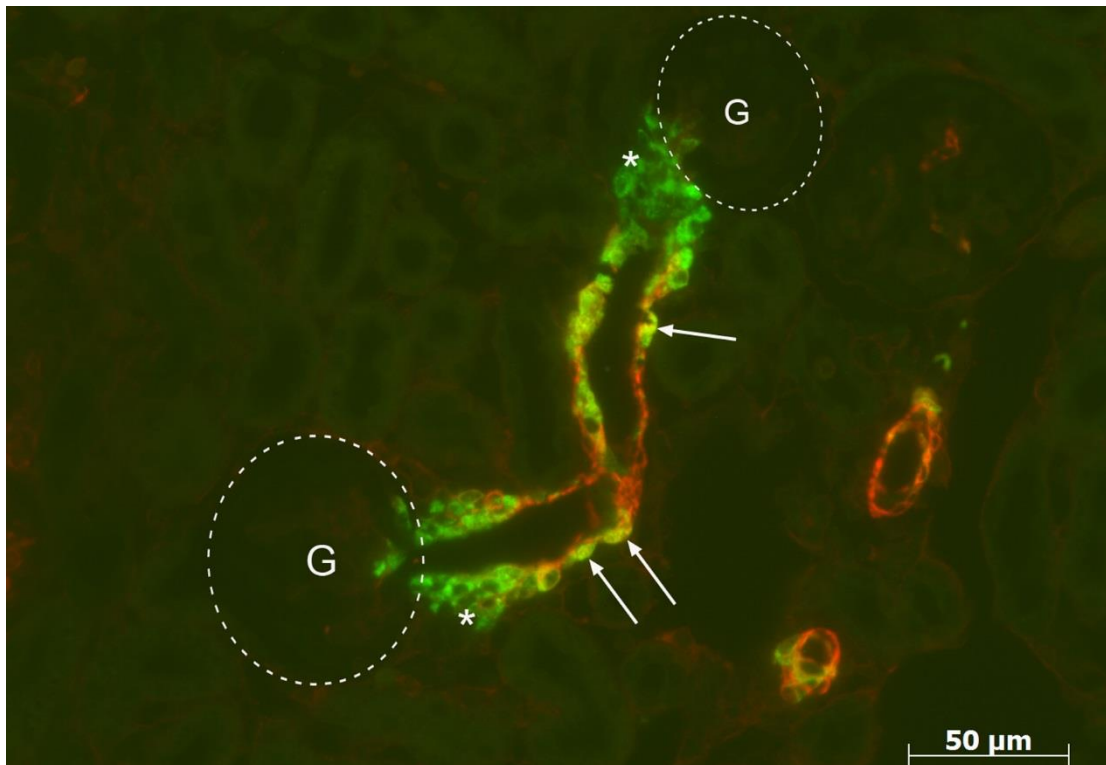


Abb. 3.6: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer **4 Wochen alten AS-Cx40-/- Maus**, juxtamedullärer Ausschnitt. Renin ist grün, Glattmuskelaktin rot und die Kolokalisation beider Proteine gelb dargestellt. G=Glomerulus. 400-fache Vergrößerung. Pfeile zeigen die retrograde Rekrutierung mit Kolokalisation beider Immunreaktionen. Sterne deuten auf Reninzellen die mehrschichtig der afferenten Arteriole aufgelagert sind.

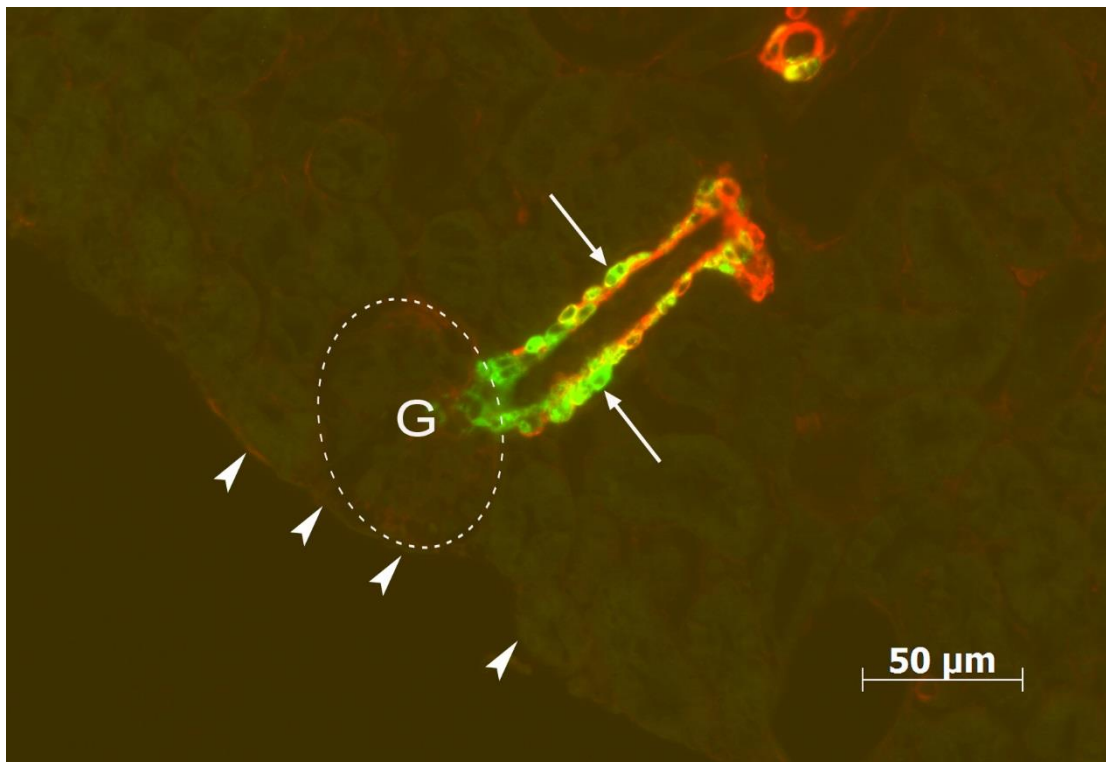


Abb. 3.7: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer **4 Wochen alten AS-Cx40-/- Maus**. Färbung und Vergrößerung wie in Abb. 3.6.. Dargestellt ist ein superfizieller Ausschnitt. Pfeile zeigen auf die der Media aufgelagerten Reninzellen. Pfeilspitzen deuten auf die direkte Kapselnähe des Glomerulus hin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der Niere der 4 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus eine merklich erhöhte Reninexpression vorliegt. Sie ist vorwiegend auf den Bereich um die afferente Arteriole beschränkt, hier jedoch nicht auf die Media begrenzt, sondern zum Teil mehrschichtig dem Gefäß anlagert. Bei den juxtamedullären Glomeruli ist diese erhöhte Reninexpression deutlicher ausgeprägt als an den superfiziellen Glomeruli. Insgesamt zeigt sich mit Ausnahme der kapselnahen Glomeruli ein homogenes Verteilungsmuster der reninbildenden Zellen.

3.2.2 Die 4 Wochen alte Wildtyp-Maus

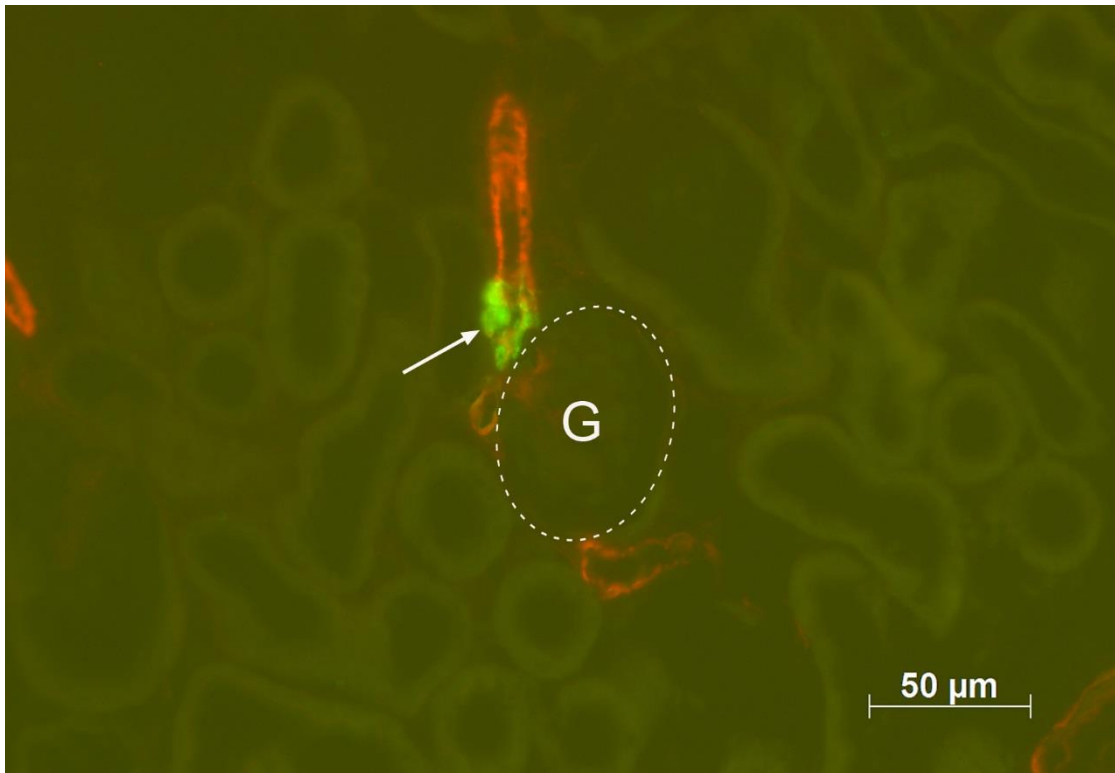


Abb. 3.8: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer **4 Wochen alten Wildtyp-Maus**. Renin ist grün, Glattemuskelaktin ist rot dargestellt. G=Glomerulus. 400-fache Vergrößerung. Pfeil: Reninzellen in juxtaglomerulärer Position.

Wie schon vorher beschrieben, ist die Lokalisation und Anzahl der reninbildenden Zellen während der Entwicklung der Niere einem steten Wandel unterlegen, der etwa 4 Wochen postpartal abgeschlossen ist.

Bei Betrachtung der histologischen Aufnahme (Abb. 3.8) einer 4 Wochen alten Wildtyp-Maus, wird die typische Lage und Menge der reninproduzierenden Zellen am terminalen Abschnitt der afferenten Arteriole in juxtaglomerulärer Position deutlich. Die Reninzellen ersetzen hier die Glattemuskelzellen der Gefäßwand und sind im Gegensatz zur 4 Wochen alten AS-Cx40/--Maus nur einreihig vorhanden.

3.3 Die 10 Wochen alte Maus

3.3.1 Die 10 Wochen alte AS-Cx40^{-/-}-Maus

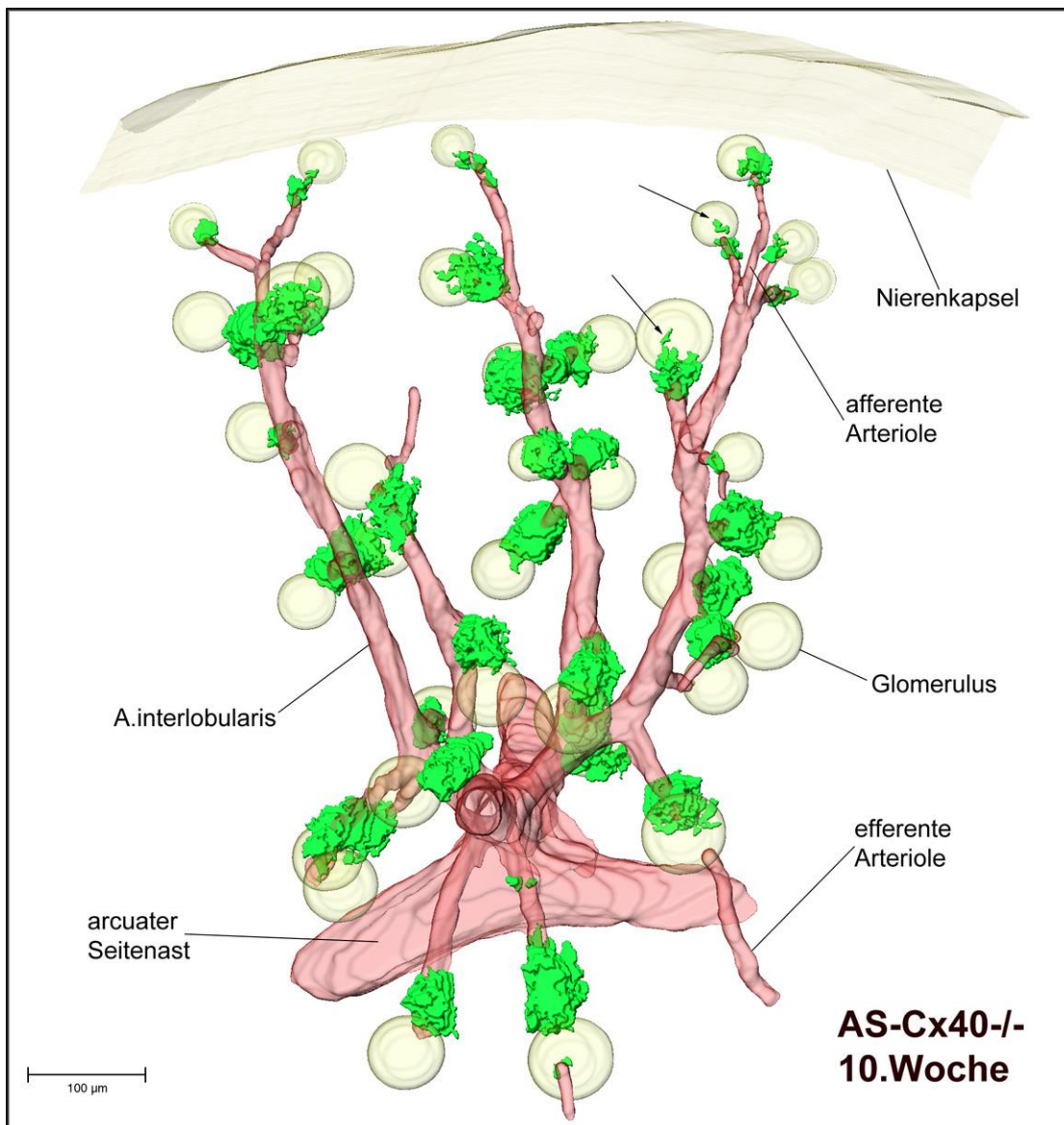


Abb. 3.9: [Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) des ausgewählten Gefäßbaumabschnittes einer **10 Wochen alten AS-Cx40^{-/-}-Maus** mit dazugehörigen Glomeruli und Kapselausschnitt (gelb).

In der 3D-Rekonstruktion des Nierenausschnittes der 10 Wochen alten AS-Cx40^{-/-}-Maus (Abb. 3.9) sind die Veränderungen im Vergleich zur 4 Wochen alten AS-Cx40^{-/-}-Maus nur gering.

Auch hier wird ein Unterschied zwischen juxtamedullären und superfiziellen Glomeruli deutlich. Bei den kapselnahen Glomeruli ist im Vergleich zur Wildtyp-Maus nur eine mäßig erhöhte Zahl von reninproduzierenden Zellen zu

sehen, welche vorwiegend auf den Bereich der afferenten Arteriolen beschränkt sind. Vereinzelt befinden sich reninexprimierende Zellen im periglomerulären Mesangium (Pfeile Abb. 3.9). Wie bei der 4 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus nehmen die reninbildenden Zellen im juxtamedullären Bereich zu. Die Zellen sitzen mehrschichtig um die Media der afferenten Arteriolen und stehen, in der Regel, untereinander in Kontakt. Wie in der Detailaufnahme (Pfeilspitze Abb. 3.10) zu sehen ist, finden sich auch reninproduzierende Zellen, die keinen Kontakt zu diesen juxtaglomerulären Zellfeldern haben. In dem vergrößerten Ausschnitt erkennt man auch Reninzellen an der efferenten Arteriole (Pfeil Abb. 3.10). Die Arteriae interlobulares und der arcuate Seitenast sind reninfrei.

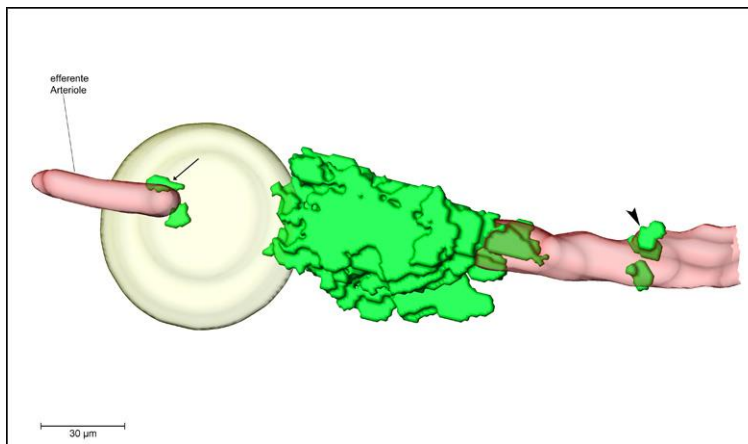


Abb. 3.10: [Detailansicht] 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) einer afferenten und einer efferenten Arteriole und des dazugehörigen Glomerulus einer **10 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus**. Pfeil: Reninzellen an der efferenten Arteriole. Pfeilspitze: Reninzellen ohne Kontakt zum juxtaglomerulären Zellverband.

In der histologischen Aufnahme (Abb. 3.11) sind juxtaglomeruläre Reninzellen zu sehen, welche mehrschichtig um die afferente Arteriole angeordnet sind (Pfeil Abb. 3.11). Dabei nimmt die Zahl trichterförmig zum Glomerulus hin immer mehr zu. Auch sind reninexprimierende Zellen im Bereich der efferenten Arteriole vorhanden (Pfeilspitze Abb. 3.11).

Im Paraffinschnitt (Pfeil Abb. 3.12) kann man deutlich reninbildende Zellen erkennen, welche keinen Kontakt zu den juxtaglomerulären Reninzellen haben. Diese scheinen den Glattmuskelzellen aufgelagert zu sein.

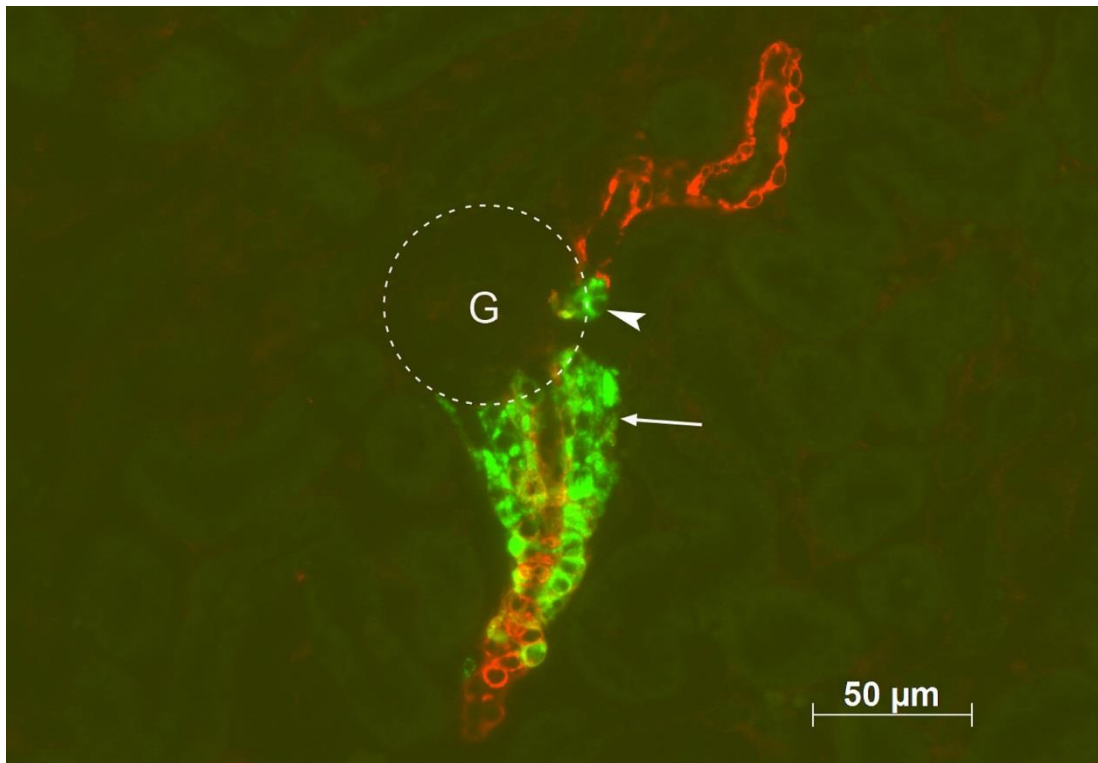


Abb. 3.11: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer **10 Wochen alten AS-Cx40^{-/-} Maus**. Renin ist grün, Glattmuskelaktin rot und die Kolokalisation beider Proteine gelb dargestellt. G=Glomerulus. 400-fache Vergrößerung. Pfeilspitze zeigt Reninzellen in der efferenten Arteriole. Pfeil deutet auf mehrschichtige Reninzellen an der afferenten Arteriole.

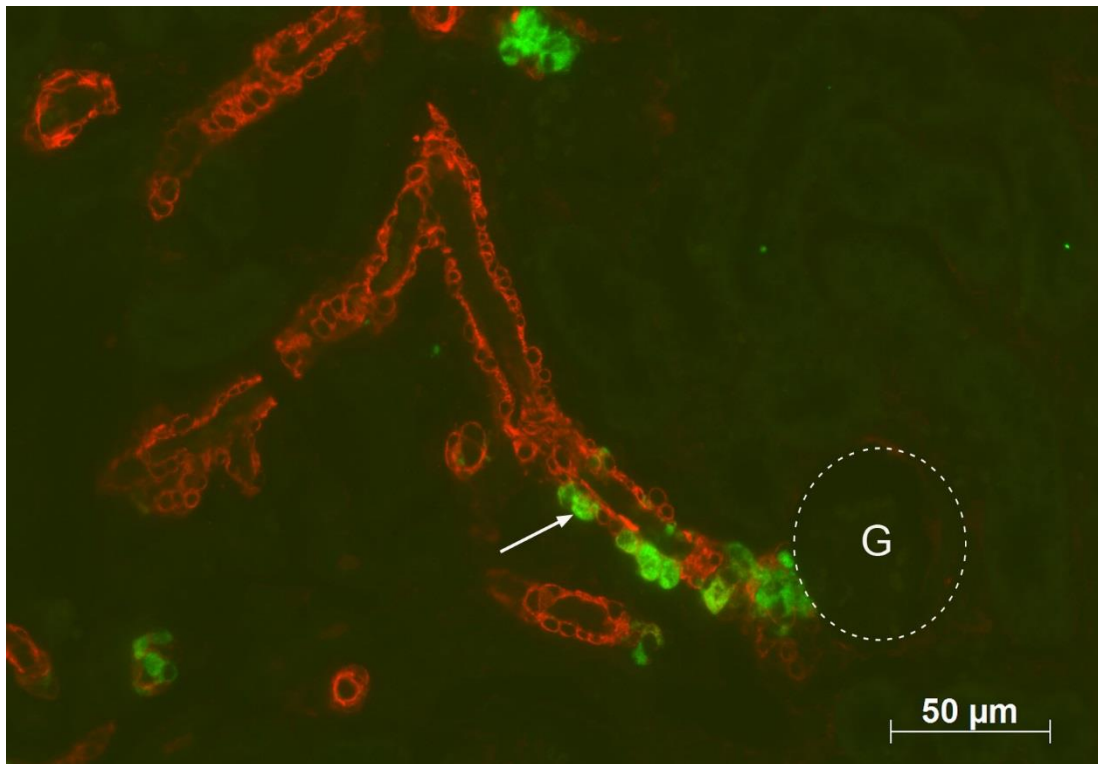


Abb. 3.12: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer **10 Wochen alten AS-Cx40^{-/-} Maus**. Färbung und Vergrößerung wie in Abb. 3.11.. Pfeil zeigt Reninzellen außerhalb des Zellverbandes.

In Zusammenschau von 3D-Rekonstruktion und mikroskopisch-histologischen Aufnahmen ähneln sich Reninexpressionsmuster der 4 Wochen alten und der 10 Wochen alten AS-Cx40/--Mäusen. Im Unterschied zur 4 Wochen alten AS-Cx40-Mäusen treten jedoch vereinzelt Reninzellen, gelöst aus dem Zellverband, in der afferenten Arteriole auf. Auch an der efferenten Arteriole findet man Reninzellen. Wie im vorhergehenden Alterstadium sind die Arteriae interlobulares und der arcuate Seitenast reninfrei.

3.3.2 Die 10 Wochen alte Wildtyp-Maus

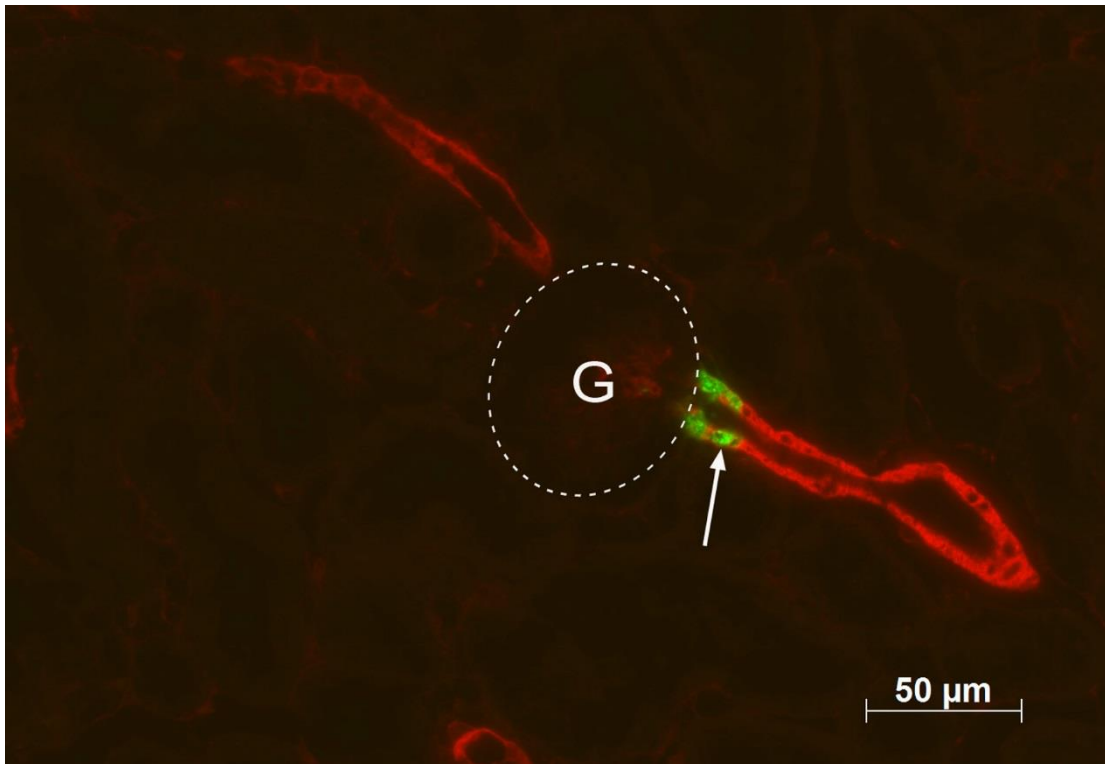


Abb. 3.13: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer **10 Wochen alten Wildtyp-Maus**. Renin ist grün, Glattmuskelaktin ist rot dargestellt. G=Glomerulus. 400-fache Vergrößerung. Pfeil: Reninzelle in der Media der afferenten Arteriole.

Bei Betrachtung der histologischen Aufnahme (Abb 3.13) eines exemplarischen Glomerulus mit afferenter und efferenter Arteriole einer 10 Wochen alten Wildtyp-Maus, erkennt man gut die physiologische Lokalisation und Anzahl von Reninzellen. Zu sehen sind wenig Reninzellen juxtaglomerulär in der Media der afferenten Arteriole liegend. Die in der 10 Wochen alten AS-Cx40/--Maus deutlich erkennbare Mehrschichtigkeit von reninbildenden Zellen, lässt sich hier nicht nachweisen.

3.4 Die 16 Wochen alte Maus

3.4.1 Die 16 Wochen alte AS-Cx40 $-/-$ Maus

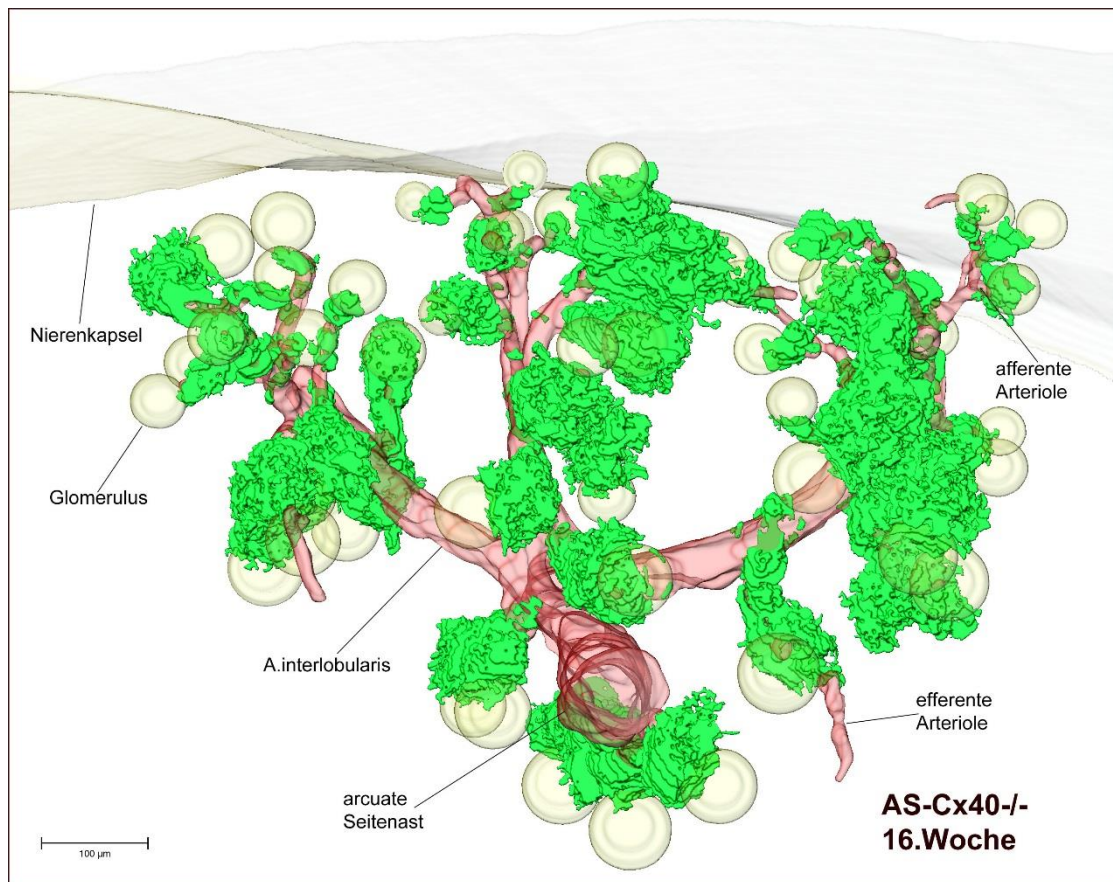


Abb. 3.14: [Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) des ausgewählten Gefäßbaumabschnittes einer **16 Wochen alten AS-Cx40 $-/-$ -Maus** mit dazugehörigen Glomeruli und Kapselausschnitt (gelb).

In dem Nierenausschnitt der 16 Wochen alten AS-Cx40 $-/-$ -Maus zeigt sich eine signifikante Zunahme der Reninexpression. So kommt es um die afferenten Arteriolen vor allem im juxtaglomerulären Bereich zu einer regelrechten Clusterbildung von Reninzellen. Wie auch in den beiden vorhergehenden Altersstadien ist diese Zunahme im Verhältnis an den superfiziellen Glomeruli weniger ausgeprägt als an den juxtamedullären Glomeruli.

Sowohl die Detailansicht (Abb. 3.15) als auch die histologische Darstellung (Abb. 3.16 und Abb. 3.17) verdeutlichen die massive Zunahme der reninbildenden Zellen. Dabei kommt es zu einer ausgeprägten Mehrschichtigkeit um die afferente Arteriole, die direkt präglomerulär am

größten ist. Wie schon bei der 10 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus beschrieben, nimmt diese trichterförmig zum Glomerulus hin zu. In den histologischen Aufnahmen erkennt man, dass es sich um kubische reninbildende Zellen ohne Kolokalisation von Renin und Glattmuskelaktin handelt (Pfeile Abb. 3.17). Neben dieser präglomerulären Mehrschichtigkeit kommt es zu einer retrograden Rekrutierung entlang der gesamten Vasa afferentia, welche teilweise bis an die Interlobulararterien reicht. Vereinzelt sind Reninzellen in den Arteriae interlobulares vorhanden (Pfeilspitzen Abb. 3.17). Der arcuate Seitenast weist keine Reninbildung auf. Es finden sich vermehrt Reninzellen auch im Bereich der Bowman'schen Kapsel, die am Gefäßpol bis an die efferente Arteriole reichen. Außerdem sind ektopische Reninzellen im periglomerulären Mesangium nachweisbar (Pfeilspitzen Abb. 3.15 und Abb. 3.16)

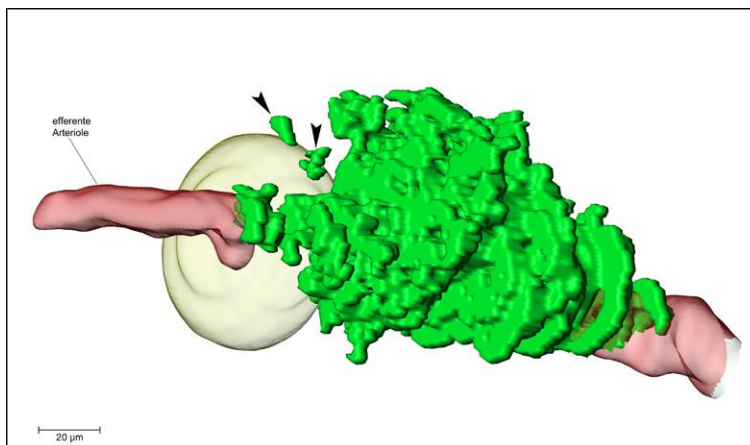


Abb. 3.15: [Detailansicht] 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) einer afferenten und einer efferenten Arteriole und des dazugehörigen juxtamedullären Glomerulus einer **16 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus**. Pfeilspitzen: ektopische Reninzellen.

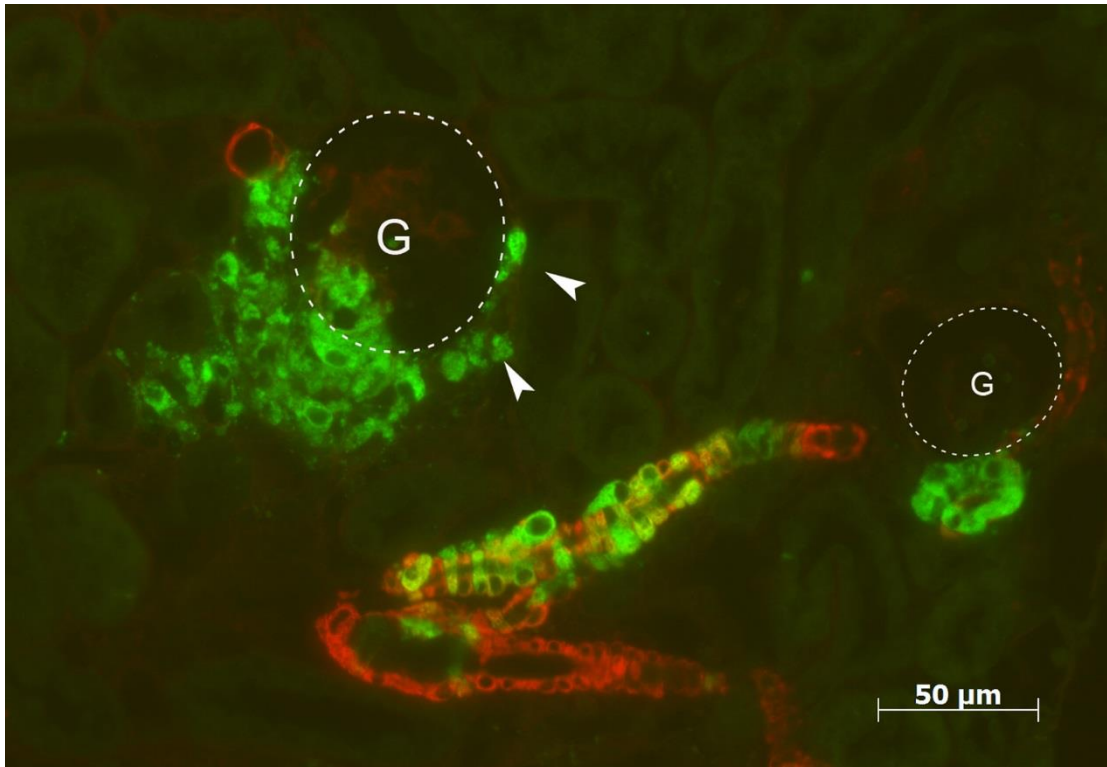


Abb. 3.16: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer **16 Wochen alten AS-Cx40-/- Maus**. Renin ist grün, Glattmuskelaktin rot und die Kolorisierung beider Proteine gelb dargestellt. G=Glomerulus. 400-fache Vergrößerung. Pfeilspitze: ektopische Reninzellen periglomerulär eines juxtamedullären Glomerulus.

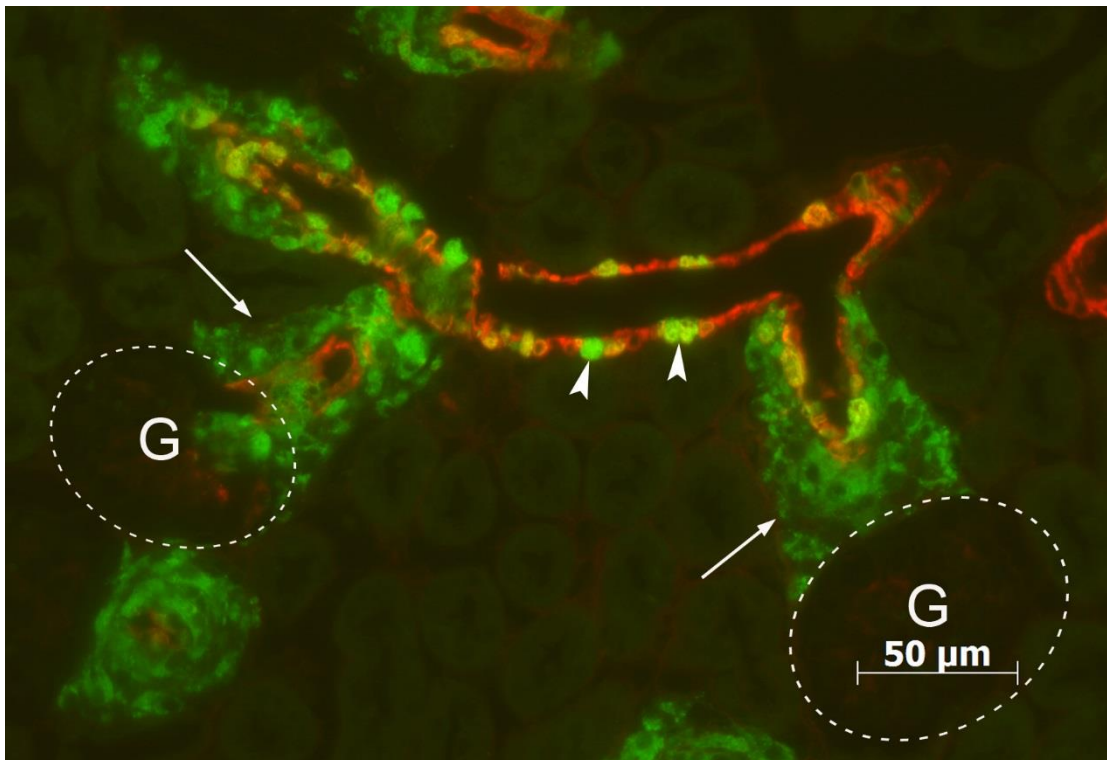


Abb. 3.17: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer **16 Wochen alten AS-Cx40-/- Maus**. Färbung und Vergrößerung wie in Abb. 3.16.. Pfeilspitzen: Reninzellen in der A. interlobularis. Pfeile deuten auf mehrschichtig, trichterförmig angeordnete Reninzellen um afferente Arteriolen.

Ein weniger gesteigertes Reninexpressionsmuster zeigt sich an den kapsel-nahen Glomeruli. In einem vergrößerten Ausschnitt ist ein superfizieller Glomerulus mit afferenter und efferenter Arteriole dargestellt (Abb. 3.18). Es finden sich Reninzellen im Bereich der Bowman'schen Kapsel (siehe Pfeilspitze) und der efferenten Arteriole. In der Detailaufnahme und besonders in der histologischen Aufnahme Abb. 3.19 ist gut zu erkennen, dass sich Reninzellen auch in ihrer typischen Lokalisation in der juxtaglomerulären Position in der Media der Arteriole (siehe Pfeil) finden.

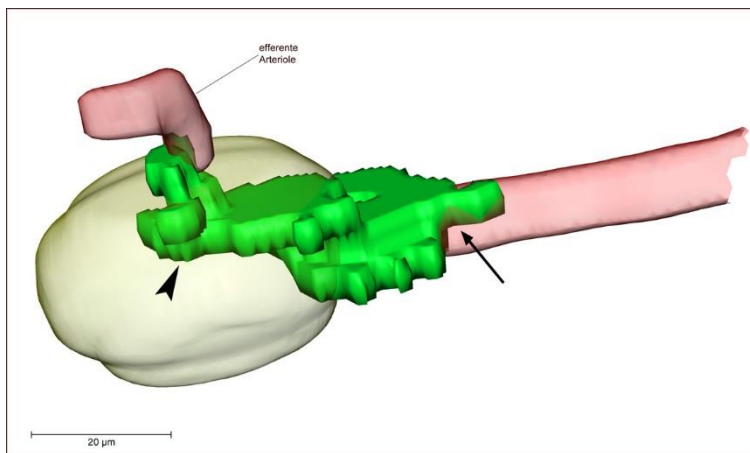


Abb. 3.18: Detailansicht einer afferenten und einer efferenten Arteriole und des dazugehörigen superfiziellen Glomerulus einer **16 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus**. Pfeilspitze: Reninzellen periglomerulär
Pfeil: Reninzellen in der afferenten Arteriole.
Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot).

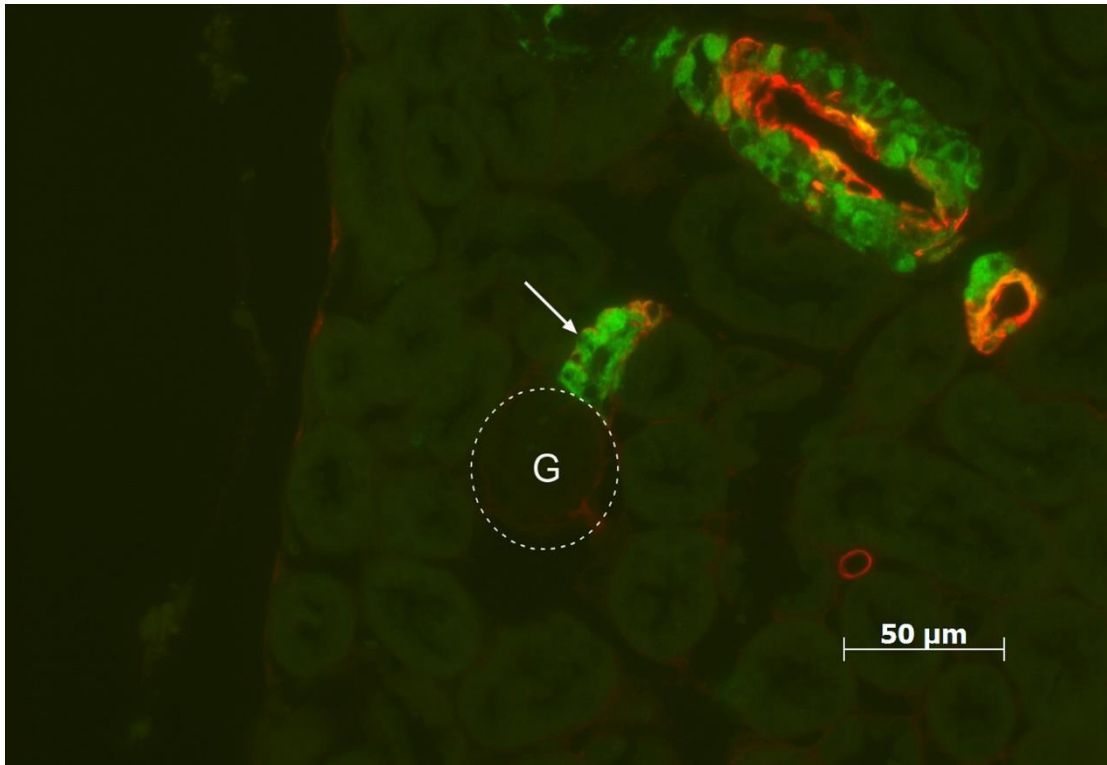


Abb. 3.19: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer **16 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus**. Renin ist grün, Glattmuskelaktin rot und die Kolokalisation beider Proteine gelb dargestellt. G=Glomerulus. 400-fache Vergrößerung. Pfeil: Reninzellen in der Media der afferenten Arteriole eines superfiziellen Glomerulus.

Ingesamt läßt sich in der 16 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus eine sigifikante Steigerung der Reninexpression feststellen. Das Muster der Verteilung ist dem der vorherigen Altersstadien ähnlich. Im Unterschied dazu reichen bei der retrograden Rekrutierung die reninbildenden Zellen bis an die Arteriae interlobulares heran. Im Gegensatz zu den jüngeren Mäusen finden sich auch vereinzelt Reninzellen in den Interlobulararterien. Ebenso hat die präglomeruläre Mehrschichtigkeit der Reninzellen zugenommen sowie die Zahl der reninbildenden Zellen um die Bowman-Kapsel.

3.4.2 Die 16 Woche alte Wildtyp-Maus

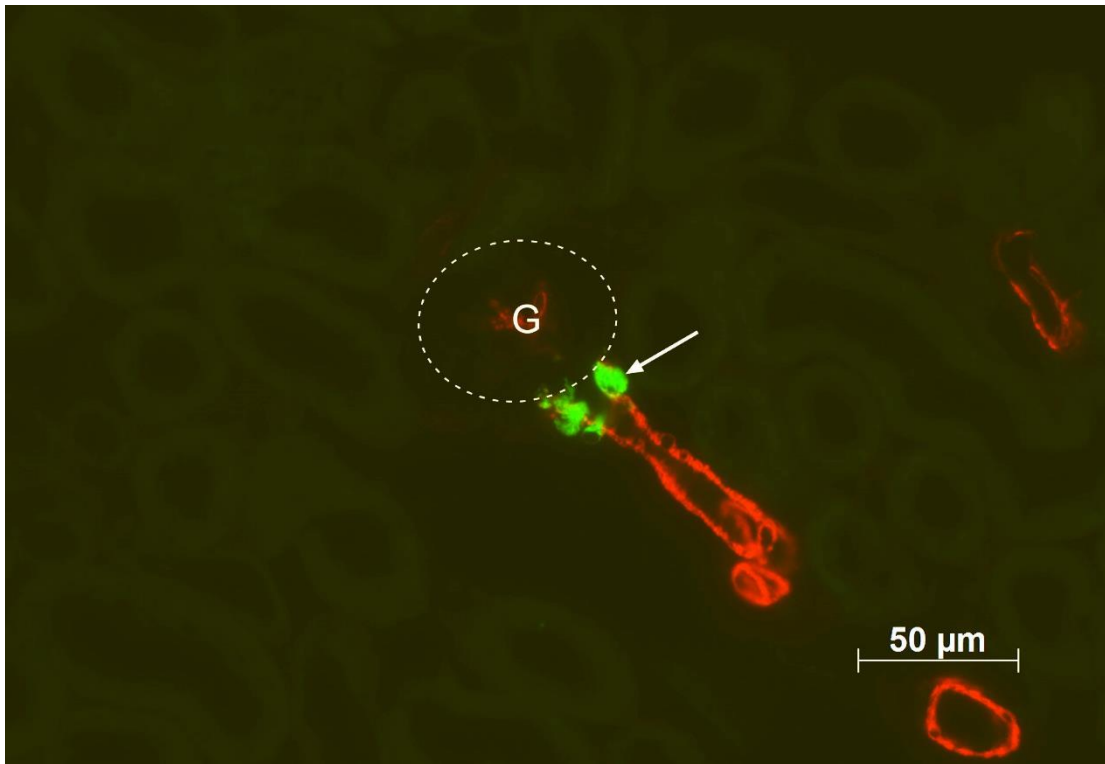


Abb. 3.20: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer **16 Wochen alten Wildtyp-Maus**. Renin ist rot, Glattmuskelaktin ist grün dargestellt. G=Glomerulus. 400-fache Vergrößerung. Pfeilspitzen: Reninzellen in juxtaglomerulärer Position.

Ein völlig anderes Bild als bei der vorher beschriebenen 16 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus mit einer massiv gesteigerten Reninexpression, ergibt sich bei der 16 Wochen alten Wildtyp-Maus. In Abb. 3.20 sieht man, so wie in den vorhergehenden Altersstufen, auch bei der 16 Wochen alten Wildtyp-Maus nur wenige reninbildende Zellen am terminalen Abschnitt der afferenten Arteriole. Im periglomerulären Mesangium und im Bereich der effereten Arteriole sind keine reninproduzierenden Zellen nachweisbar, auch die Interlobulararterien sind reninfrei.

3.5 Die 22 Wochen alte Maus

3.5.1 Die 22 Wochen alte AS-CX40^{-/-}-Maus

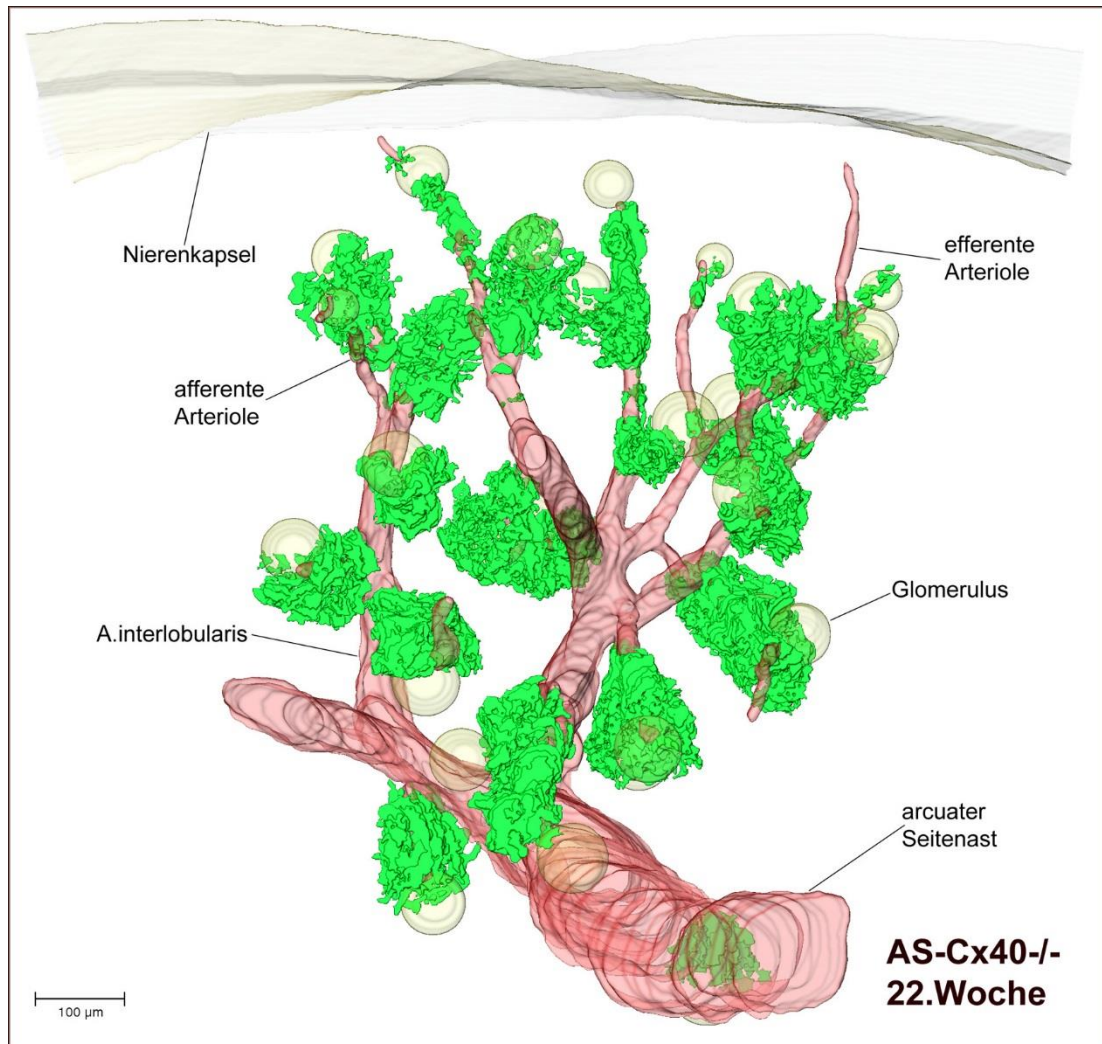


Abb. 3.21: [Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) des ausgewählten Gefäßbaumabschnittes einer **22 Wochen alten AS-Cx40^{-/-}-Maus** mit dazugehörigen Glomeruli und Kapselausschnitt (gelb).

Im nächsten zu untersuchendem Stadium waren die Mäuse 22 Wochen alt. Die Reninmenge scheint relativ homogen verteilt mit Ausnahme der kapselnahen Glomeruli. Hier finden sich, wie schon in allen vorangegangenen Altersstadien im Verhältnis zu den juxtamedullären Glomeruli deutlich weniger reninbildende Zellen.

An den juxtamedullären Glomeruli ist in der 3D-Rekonstruktion ein ähnliches Reninexpressionsmuster wie bei der 16 Wochen alten AS-Cx40^{-/-}-Maus zu

erkennen. Allerdings gibt es eine weitere Zunahme der Mehrschichtigkeit. Während sich bei den vorherigen Altersstadien die Reninzellen im Bereich des Gefäßpols von afferenter und efferenter Arteriole befanden, breiten sich nun die reninbildende Zellen um die Bowman'sche Kapsel deutlich stärker aus. In der Detailansicht (Abb. 3.22) wird diese Zunahme der reninbildenden Zellen um den Glomerulus (siehe Pfeil) offenkundig.

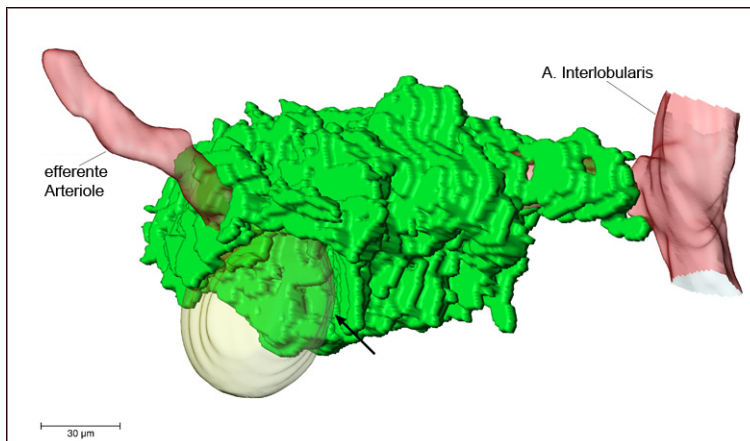


Abb. 3.22: Detailansicht einer efferenten Arteriole und des dazugehörigen Glomerulus einer **22 Wochen alten AS-Cx40/-Maus**. Pfeil: Reninzellen im Bereich der Bowman-Kapsel. Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot).

Dieses Phänomen wird auch in den mikroskopischen Aufnahmen Abb. 3.23 und Abb. 3.24 deutlich. Es finden sich reninbildende Zellen nicht mehr nur manschettenartig um die afferenten Arteriolen sondern auch vermehrt im Bereich der efferenten Arteriolen (Pfeilspitzen Abb. 3.23). Diese Ausbreitung der reninproduzierenden Zellen ist an einigen Glomeruli so ausgeprägt, dass die gesamte Bowman'sche Kapsel regelrecht umschlossen ist (Pfeilspitzen Abb. 3.24). Ausserdem breiten sich die Reninzellen bis in den tubulointerstitiellen Raum aus.

Neben diesen Renin exprimierenden Zellen in atypischer Lokalisation, sind reninbildende Zellen auch in typischer juxtaglomerulärer Position in der Media der afferenten Arteriolen vorhanden (Pfeile Abb. 3.24).

Zusätzlich sind vereinzelte Zellen in der Gefäßwand der Interlobulararterien zu sehen. (Pfeile Abb. 3.23). Der arcuate Seitenast ist reninfrei.

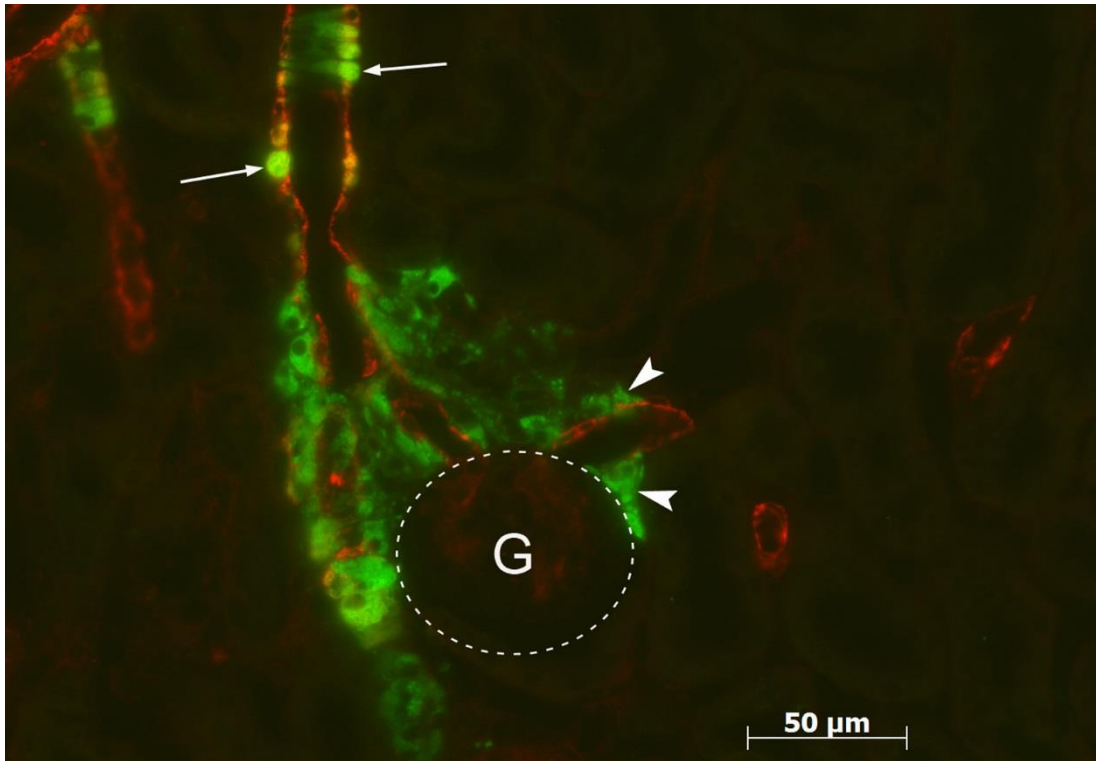


Abb. 3.23: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer **22 Wochen alten AS-Cx40-/- Maus**. Renin ist grün, Glattmuskelaktin rot und die Kolo-kalisation beider Proteine gelb dargestellt. G=Glomerulus, juxtamedullär. 400-fache Vergrößerung. Pfeil: Reninzellen in der Media der Interlobulararterie. Pfeilspitzen: Reninzellen im Bereich der efferenten Arteriole.

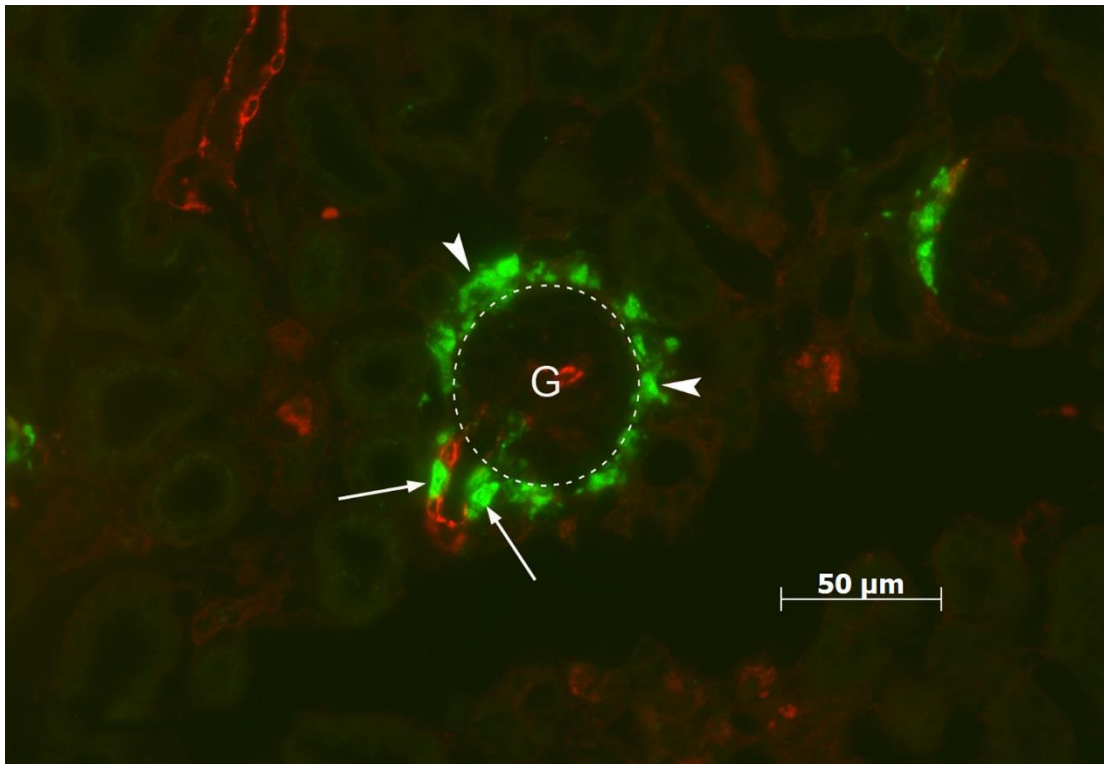


Abb. 3.24: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer **22 Wochen alten AS-Cx40-/- Maus**. Färbung und Vergrößerung wie in Abb. 3.23.. Dargestellt ist ein superfi-zie-ll gelegener Glomerulus. Pfeil: Reninzellen in der Media der afferenten Arteriole. Pfeilspitzen: Reninzellen im Bereich der Bowman'schen Kapsel.

So kann man bei Betrachtung von 3D-Rekonstruktion und histologischen Aufnahmen bei der 22 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus eine ähnlich starke Reninexpression wie bei der 16 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus erkennen. Auch das Verteilungsmuster der reninbildenden Zellen entspricht weitgehend dem der jüngeren Mäuse.

Allerdings kommt es, im Unterschied zu den vorhergehenden Alterstadien, zu einer noch stärkeren Ausbreitung reninproduzierender Zellen um die Bowman'sche Kapsel. Es ist hier nicht mehr nur eine manschettenartige Ausbreitung um die afferente Arteriole zu finden sondern auch eine erhöhte Anzahl von Reninzellen perivaskulär im Bereich der efferenten Arteriole. Weiterhin sind in diesem Altersstadium marknahe Glomeruli auffallend, deren Bowman'sche Kapsel von reninbildenden Zellen regelrecht umschlossen ist. Zudem sind auch Reninzellen im tubulo-interstitiellen Raum erkennbar.

3.5.2 Die 22 Wochen alte Wildtyp-Maus

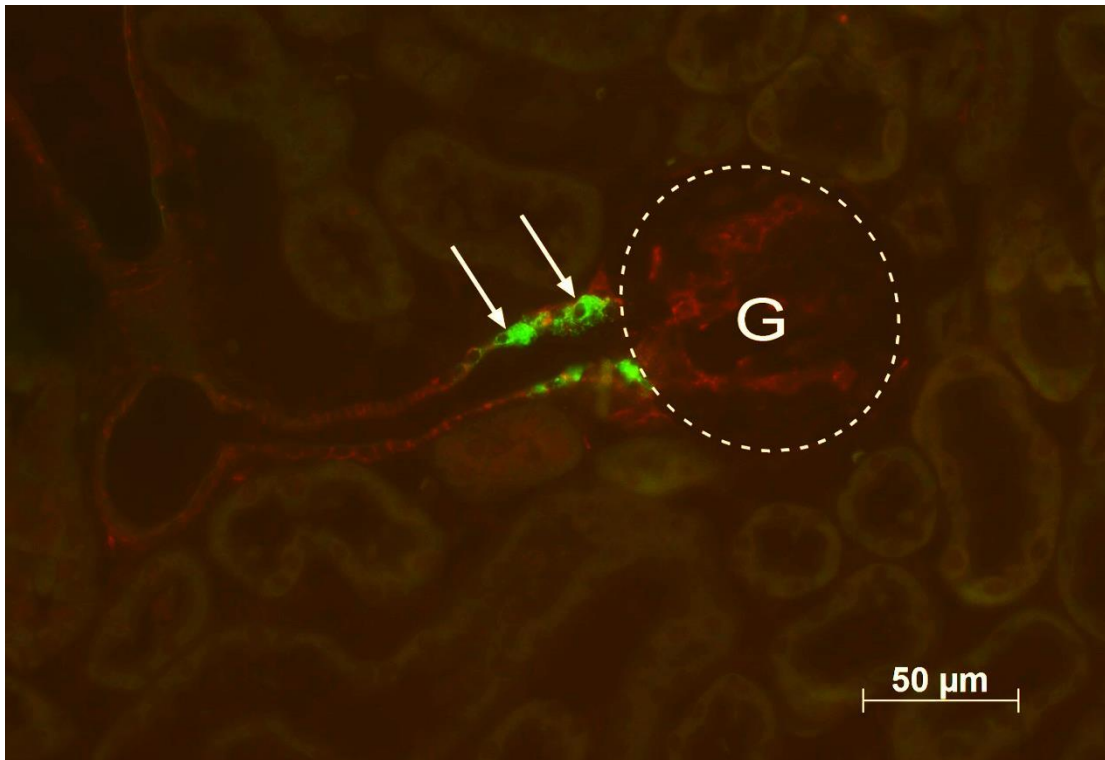


Abb. 3.25: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer **22 Wochen alten Wildtyp-Maus**. Renin ist grün dargestellt. G=Glomerulus. 400-fache Vergrößerung. Pfeilspitzen: Reninzellen in juxtaglomerulärer Position.

Auch bei der 22 Wochen alten Wildtyp-Maus ergibt sich das gewohnte Bild einer physiologischen Reninexpression. Ganz im Gegensatz zur 22 Wochen alten AS-Cx40^{-/-}-Maus, bei der es sowohl zu einer massiven Zunahme als auch zu einer atypischen Lokalisation der reninbildenden Zellen kam, ist im Paraffinschnitt (Abb. 3.25) bei der gleichaltrigen Wildtyp-Maus das typische Verteilungsmuster weniger Reninzellen in juxtaglomerulärer Position zu sehen. Im Bereich der efferenten Arteriole und der Bowman'schen Kapsel sind keine reninbildenden Zellen zu erkennen.

3.6 Die 34 Wochen alte Maus

3.6.1 Die 34 Wochen alte AS-Cx40/-Maus

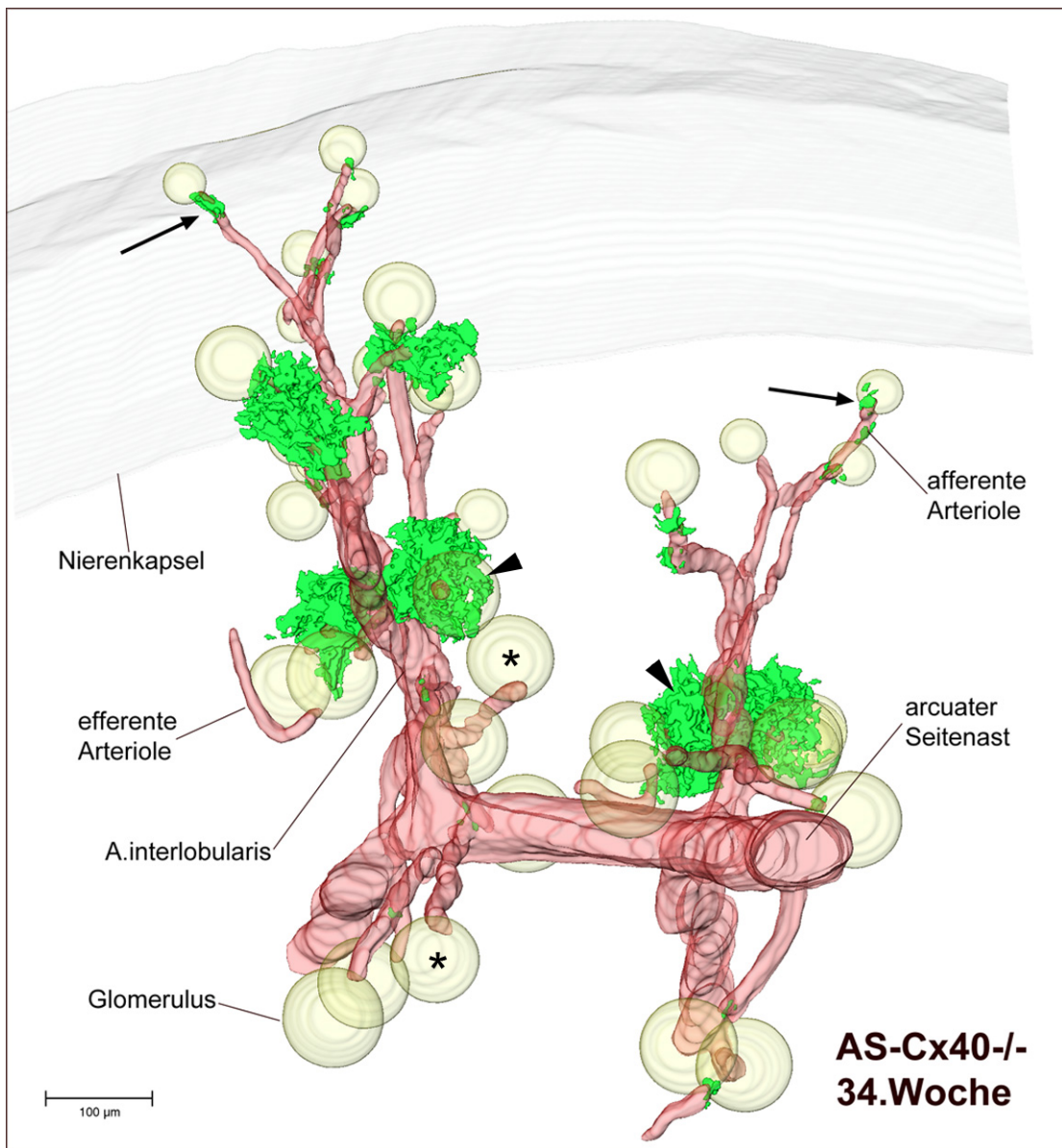


Abb. 3.26: [Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) des ausgewählten Gefäßbaumabschnittes einer **34 Wochen alten AS-Cx40/-Maus** mit dazugehörigen Glomeruli und Kapselausschnitt (gelb). Pfeile: Reninzellen in juxtaglomerulärer Position. Pfeilspitzen: juxtamedulläre Glomeruli mit ausgeprägter Reninexpression. Sterne: juxtamedulläre Glomeruli ohne Reninexpression.

Im Vergleich zur Wildtyp-Maus, kommt es im Laufe der verschiedenen Altersstufen der AS-Cx40/-Mäuse zu einer Zunahme der Reninzellen, beziehungsweise bei der 22 Wochen alten AS-Cx40/-Maus zu einer annähernd gleichbleibend hohen Zahl an Reninzellen. Auch liegt stets ein ähnliches Verteilungsmuster vor.

Ein völlig anderes Bild ergibt die 3D-Rekonstruktion der 34 Wochen alten AS-Cx40/-/-Maus. Die Zahl der reninproduzierenden Zellen an den superfiziellen Glomeruli geht insgesamt zurück. Dabei sind die noch vorhandenen Reninzellen primär in juxtaglomerulärer Position lokalisiert (siehe Pfeile Abb. 3.26), jedoch nicht so stringent in der Media am terminalen Abschnitt der afferenten Arteriole wie bei den Wildtyp-Mäusen. Zudem sind Reninzellen auch im Bereich der Bowman'schen Kapsel und in weiter proximal gelegenen Abschnitten der afferenten Arteriolen vorhanden.

Auffallend ist die deutliche Zweiteilung der Reninexpression an den juxtamedullären Glomeruli. Bei einem Großteil der Glomeruli, die von einer aus der Interlobulararterie abzweigenden afferenten Arteriolen versorgt werden, ist die Expression der Reninzellen ähnlich dem der vorhergehenden Altersstadien sehr stark ausgeprägt (siehe Pfeilspitzen Abb. 3.26). Dagegen ist an den Glomeruli, deren afferente Arteriolen direkt aus dem arcuaten Seitenast entspringen oder deren Abgang aus der Interlobulararterie sehr nahe des arcuaten Seitenastes liegt, ein völlig differentes Bild erkennbar. So sind an diesen Glomeruli nur sehr wenige beziehungsweise an manchen Glomeruli keine reninpositiven Zellen vorhanden (siehe Sterne Abb. 3.26). Bei Betrachtung der Detailansichten wird dieser Unterschied noch deutlicher. So ist in einem Ausschnitt aus der 3D-Rekonstruktion (Abb. 3.27) ein Glomerulus abgebildet, der ein den vorhergehenden Alterstadien ähnliches Expressionsmuster von Reninzellen zeigt.

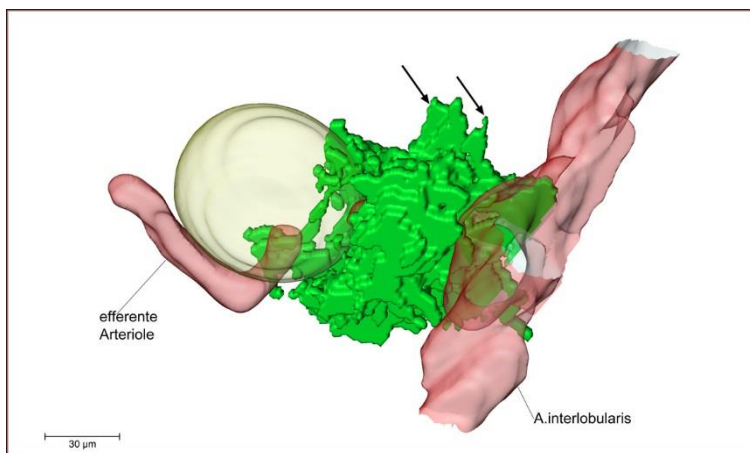


Abb. 3.27: Detailansicht einer afferenten und einer efferenten Arteriole und des dazugehörigen Glomerulus einer **34 Wochen alten AS-Cx40/-/-Maus**.

Pfeile: Reninzellen im tubulo-interstitiellen Raum. Renin (grün), Glattmuskel-aktin (rot).

Dabei befindet sich der größte Teil der Reninzellen perivaskulär um die afferente Arteriole. Wie bei den 16 und 22 Wochen alten Mäusen kommt es auch hier zu einer retrograden Rekrutierung, die teilweise bis an die Arteria interlobularis reicht.

Allerdings scheint die Menge an reninpositiven Zellen im Bereich der Bowman'schen Kapsel rückläufig. Dafür kommt es, wie sowohl in der Detailansicht (Pfeile Abb. 3.27) als auch in der histologischen Darstellung (Pfeile Abb. 3.28) gut zu erkennen ist, zu einer vermehrten Ausbreitung in den tubulointerstitiellen Raum.

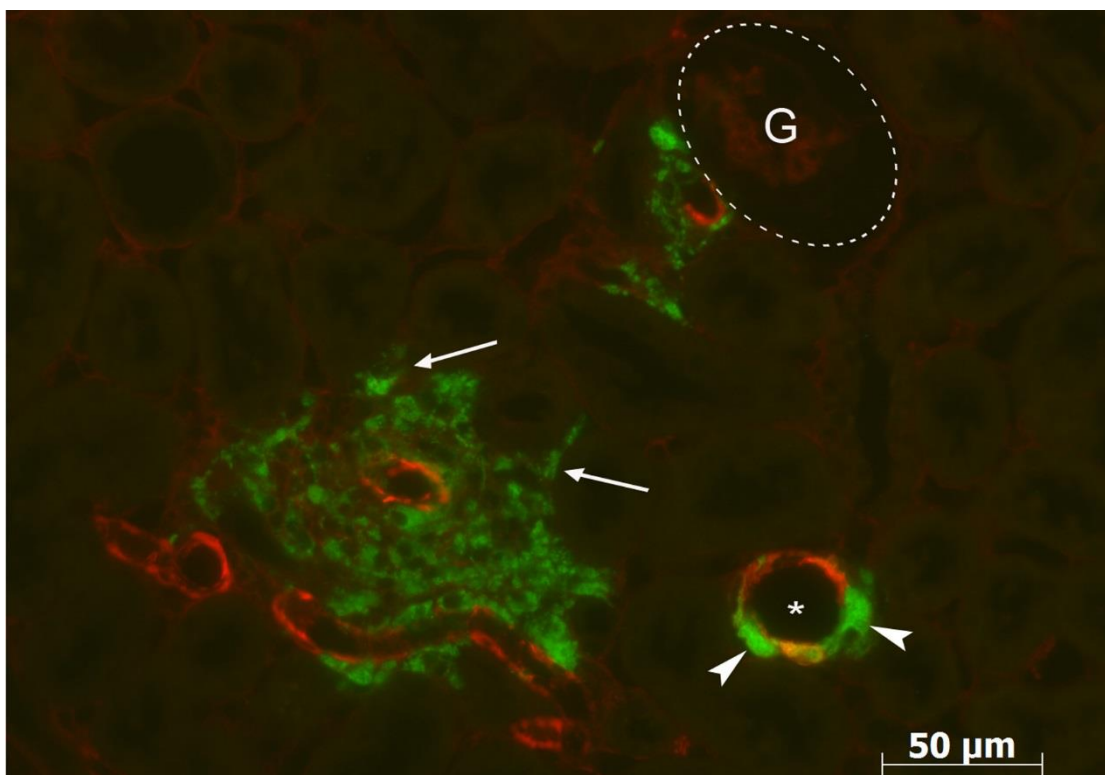


Abb. 3.28: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer **34 Wochen alten AS-Cx40-/- Maus**. Renin ist grün, Glattmuskelaktin rot und die Kolokalisation beider Proteine gelb dargestellt. G=Glomerulus. 400-fache Vergrößerung. Pfeile: Reninzellen im tubulointerstitiellen Raum. Pfeilspitzen: Reninzellen in der Gefäßwand der Interlobulararterie. Stern: Lumen der Arteria interlobularis.

Auch sind, wie in den vorherigen Alterstadien, vereinzelt reninpositive Zellen in der Gefäßwand der Interlobulararterien (Pfeilspitzen Abb. 3.28) vorhanden. Wie schon Eingangs erwähnt ist bei den juxtamedullären Glomeruli, deren zugehörige afferenten Arteriolen direkt aus dem arcuaten Seitenast versorgt werden oder dem arcuaten Seitenast sehr nahe Abgänge aus den Interlobulararterien besitzen, ein drastischer Rückgang der Reninexpression

erkennbar. So ist, wie in der Detailaufnahme (Abb. 3.29) anschaulich wird, nur noch eine sehr geringe Menge an reninpositiven Signalen an der afferenten (siehe Pfeil) und efferenten Arteriole (siehe Pfeilspitze) vorhanden.

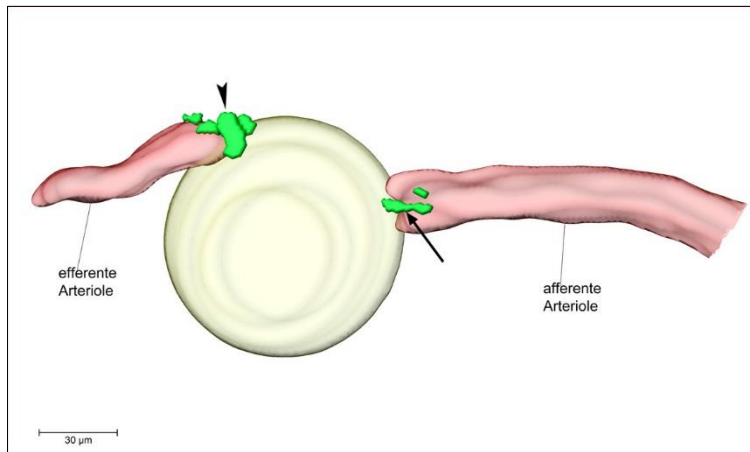


Abb. 3.29: Detailansicht einer afferenten und einer efferenten Arteriole und des dazugehörigen Glomerulus einer **34 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus**. Pfeil: Reninsignale an der afferente Arteriole. Pfeilspitze: Reninzellen an der efferente Arteriole. Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot).

Wie schon in der Gesamtansicht Abb. 3.26 auffallend ist, gibt es neben juxtamedullären Glomeruli mit stark verminderter Reninexpression auch Glomeruli ohne Reninsignale. Dieses Phänomen ist gut in der histologischen Darstellung (Abb. 3.30) zu sehen. Hier sind weder im Bereich der afferenten Arteriole (Pfeil) noch im Bereich der efferenten Arteriole (Pfeilspitze) Reninsignale vorhanden. Ebenso ist der Bereich der Bowman'schen Kapsel reninfrei.

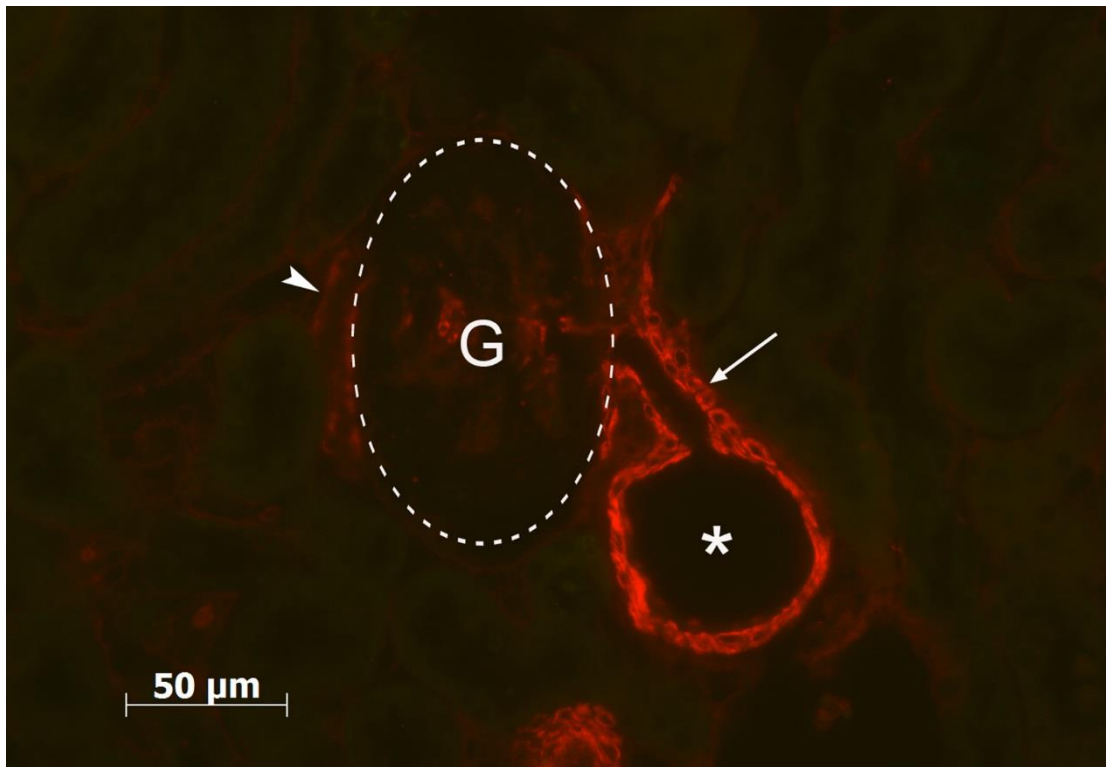


Abb. 3.30: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer **34 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus**. Renin ist grün, Glattmuskelaktin ist rot dargestellt. G=Glomerulus. 400-fache Vergrößerung. Pfeil: afferente Arteriole. Pfeilspitze: efferente Arteriole. Stern: Lumen der Arteria interlobularis.

Generell bietet sich in der Niere der 34 Woche alten AS-Cx40-/-Maus ein völlig verändertes Reninexpressionsmuster, sowohl im Vergleich zur Wildtyp-Maus als auch zu den jüngeren Altersstadien der AS-Cx40-/-Mäusen.

Bisher war bei den Knockout-Mäusen ein relativ homogenes Verteilungsmuster erkennbar, bei dem sich nur superfizielle und juxtamedulläre Glomeruli in der Reninmenge unterschieden. Bei der 34 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus ist dieses Verteilungsmuster gänzlich aufgehoben. Die superfiziellen Glomeruli weisen eine deutlich rückläufige Zahl von Reninzellen auf. Bei den juxtamedullären Glomeruli hingegen kommt es zu einer Zweiteilung, bei der an dem arcuaten Seitenast nahen Glomeruli nur sehr wenig oder keine Reninzellen vorhanden sind. Glomeruli, die kapselwärts weiter entfernt vom arcuaten Seitenast liegen, entsprechen dem Verteilungsmuster der 16 und 22 Wochen alten Mäuse. Allerdings mit einer leichten Abnahme von reninbildenden Zellen um die Bowman'schen Kapsel, jedoch einer vermehrten Ausbreitung in den tubulointerstitiellen Raum.

3.6.2 Die 34 Wochen alte Wildtyp-Maus

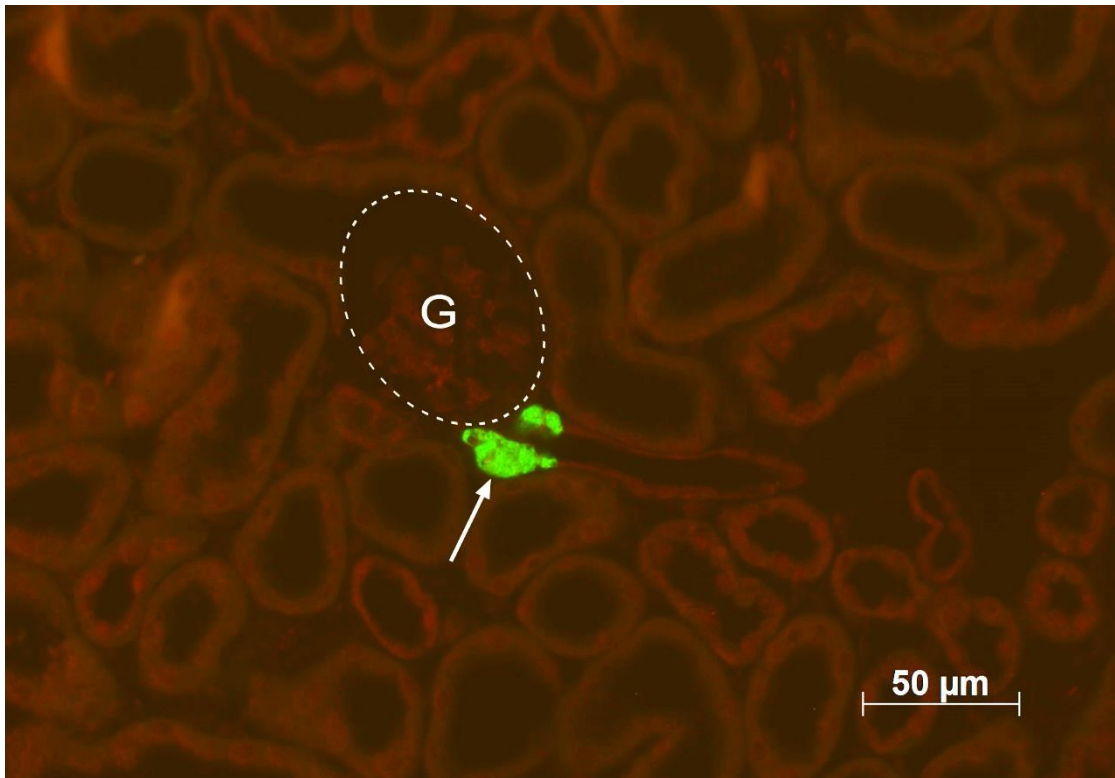


Abb. 3.31: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer **34 Wochen alten Wildtyp-Maus**. Renin ist grün, Glattmuskelaktin ist rot dargestellt. G=Glomerulus. 400-fache Vergrößerung. Pfeil: Reninzellen in der Media der afferenten Arteriole.

Betrachtet man die histologische Darstellung (Abb. 3.31) einer 34 Wochen alten Wildtyp-Maus, so sind, wie auch schon bei den jüngeren Wildtyp-Mäusen, wenige Reninzellen in der Wand der afferenten Arteriole in juxtaglomerulärer Position erkennbar.

3.7 Die 46 Wochen alte Maus

3.7.1 Die 46 Wochen alte AS-Cx40^{-/-}-Maus

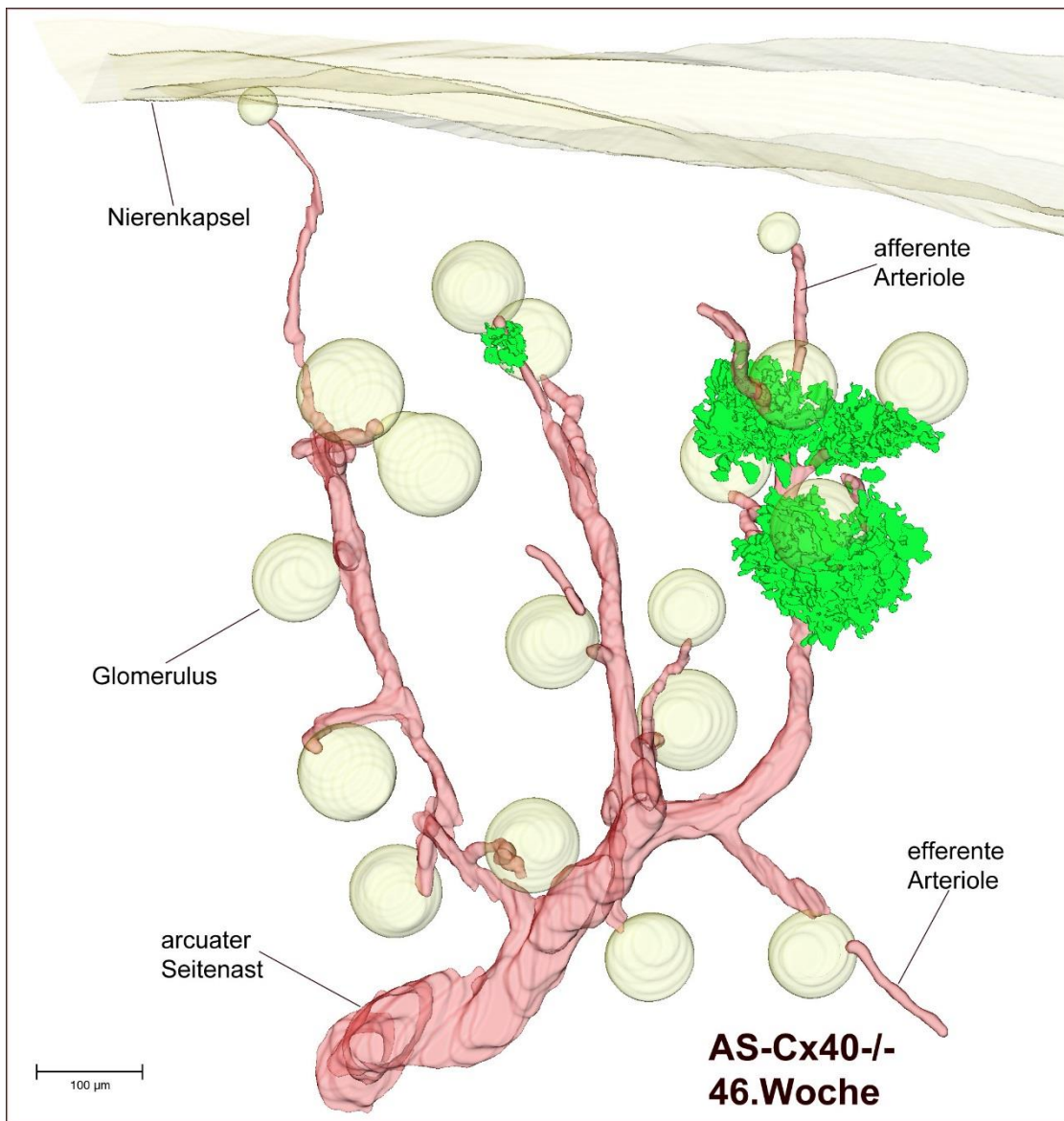


Abb. 3.32: [Gesamtansicht] 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) des ausgewählten Gefäßbaumabschnittes einer **46 Wochen alten AS-Cx40^{-/-}-Maus** mit dazugehörigen Glomeruli und Kapselausschnitt (gelb).

Bei Betrachtung der 3D-Rekonstruktion der 46 Wochen alten AS-Cx40^{-/-}-Maus wird ein extremer Rückgang der Reninexpression deutlich. So waren bei der 34 Wochen alten AS-Cx40^{-/-}-Maus nur vereinzelt Glomeruli ohne Reninsignale vorhanden. In diesem Nierenausschnitt ist die Mehrzahl der Glomeruli vollständig reninfrei. Bei den wenigen Glomeruli, in deren

Umgebung sich reninproduzierende Zellen befinden, ist ein ähnliches Lokalisationsmuster wie den vorhergehenden Alterstadien erkennbar.

Das Fehlen von reninpositiven Zellen ist dabei gleichermaßen an superfiziellen und an juxtamedullären Glomeruli zu beobachten.

In der histologischen Darstellung (Abb. 3.33) bei der superfizielle Glomeruli abgebildet sind, ist kein reninpositives Immunfluoreszenzsignal an der afferenten Arteriole (siehe Pfeil) und periglomerulär vorhanden.

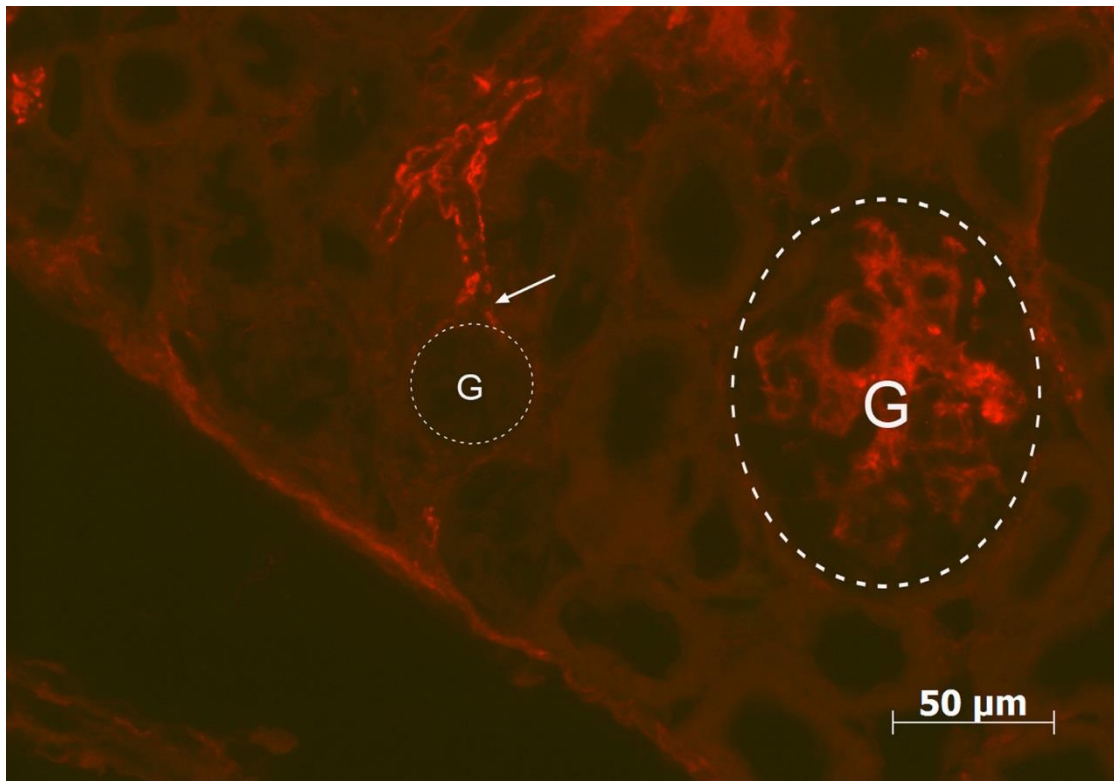


Abb. 3.33: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer **46 Wochen alten AS-Cx/-/- Maus**. Glattmuskelaktin ist rot dargestellt. G=Glomerulus. 400-fache Vergrößerung. Pfeil: afferente Arteriole.

Auch bei der Mehrzahl der juxtamedullären Glomeruli sind weder im Bereich der afferenten oder efferenten Arteriole, noch, wie in den vorhergehenden Altersstadien, im Bereich der Bowman'schen Kapsel reninpositive Zellen vorhanden.

Dieser Befund wird auch im Paraffinschnitt (Abb. 3.34) deutlich, bei dem an den afferenten Arteriolen und periglomerulär (siehe Pfeilspitzen) der drei am unteren Bildrand liegenden Glomeruli keinerlei Reninsignale sichtbar sind. Auch die Interlobulararterie ist reninfrei.

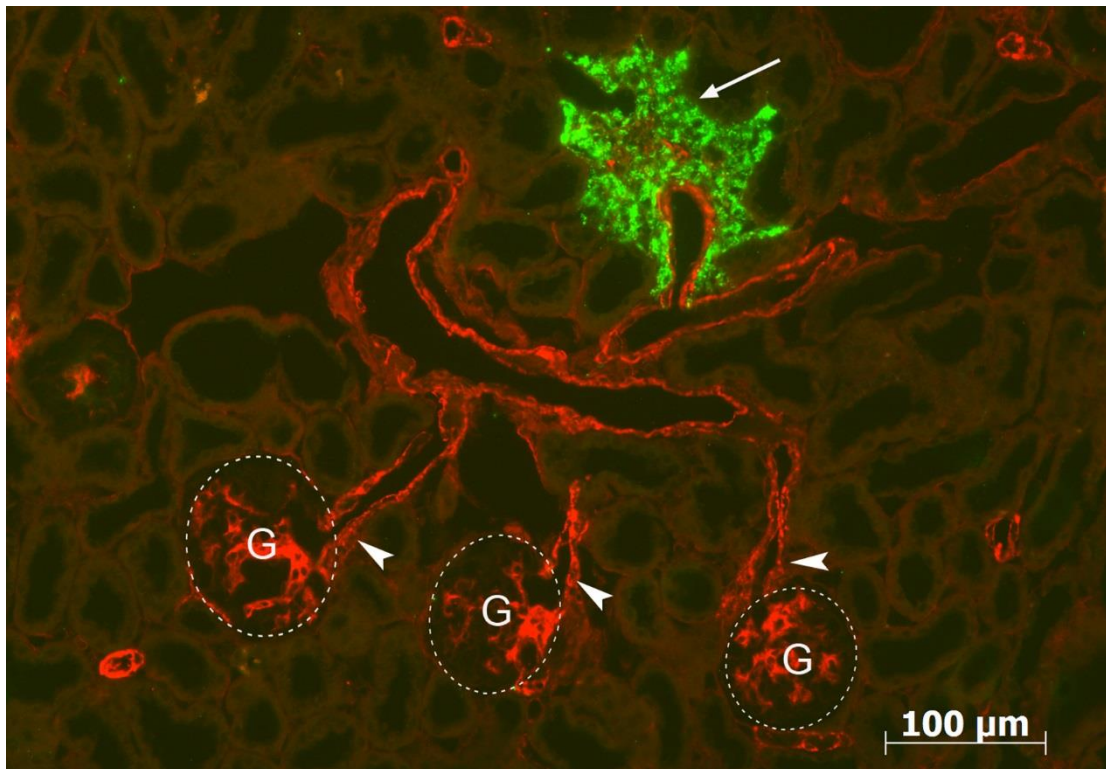


Abb. 3.34: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer **46 Wochen alten AS-Cx^{-/-} Maus**. Renin ist grün, Glattmuskelaktin ist rot dargestellt. G=Glomerulus. 200-fache Vergrößerung. Pfeilspitzen: afferente Arteriolen. Pfeil: Reninzellen im tubulointerstitiellen Raum.

Neben diesen mehrheitlich reninfreien Glomeruli ist in der Gesamtansicht (Abb. 3.32) auch ein superfizieller Glomerulus mit mäßig gesteigerter Reninexpression zu sehen. In der Detailansicht (Abb. 3.35) ist dieser reninhaltige Glomerulus dargestellt. Es zeigen sich reninbildende Zellen in typisch juxtaglomerulärer Position, jedoch nicht auf die Media beschränkt sondern perivaskulär manschettenartig in mehreren Schichten um die afferente Arteriole gelegen.

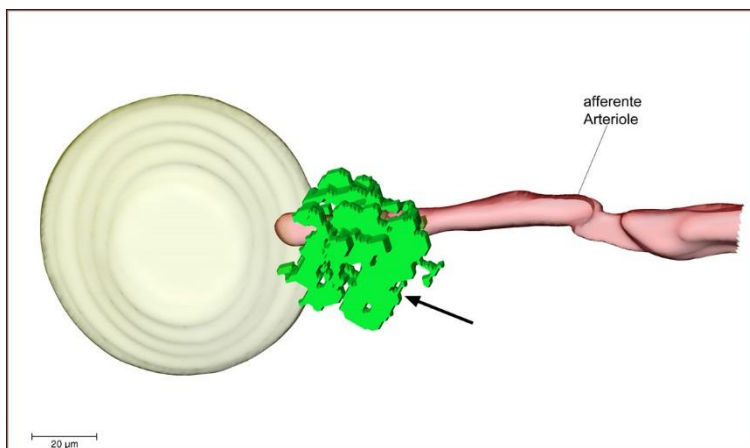


Abb. 3.35: Detailansicht einer afferenten Arteriole mit Glomerulus einer **46 Wochen alten AS-Cx40^{-/-} Maus** mit perivaskulär gelegenen Reninzellen (Pfeil). Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot).

Im Vergleich dazu finden sich an einer der drei Interlobulararterien, die in der 3D-Rekonstruktion dargestellt sind, mehrere Glomeruli mit sehr hohem Reninzellaufkommen.

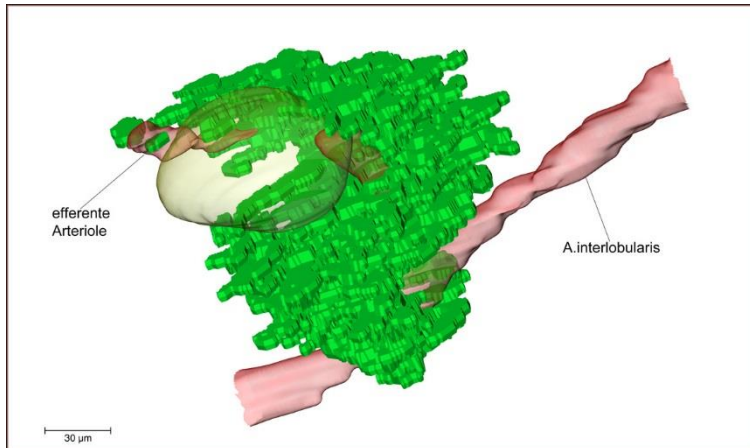


Abb. 3.36: Detailansicht einer A. interlobularis mit afferenten Arteriole und des dazugehörigen Glomerulus einer **46 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus**. Renin (grün), Glattmuskelaktin (rot).

In einem Ausschnitt der Interlobulararterie und einem von ihr versorgten Glomerulus ist zu erkennen, dass die reninbildenden Zellen in ähnlicher Position lokalisiert sind, wie in den beiden vorherigen Alterstadien. So liegt der größte Teil der Reninzellen perivaskulär um die afferente Arteriole. Allerdings in so großer Menge, dass sich die Reninzellen weit in den tubulointerstitiellen Raum ausbreiten. Dieses Phänomen ist gut in den beiden Paraffinschnitten (siehe Pfeile Abb. 3.34 und Abb. 3.37) zu beobachten. In der Detailansicht (Abb. 3.36) kann man zudem eine retrograde Rekrutierung bis zurück zu Interlobulararterie sehen. Weiterhin zeigt sich eine Ausdehnung um die Bowman'sche Kapsel, sowie auch renin-bildende Zellen im Bereich der efferenten Arteriole.

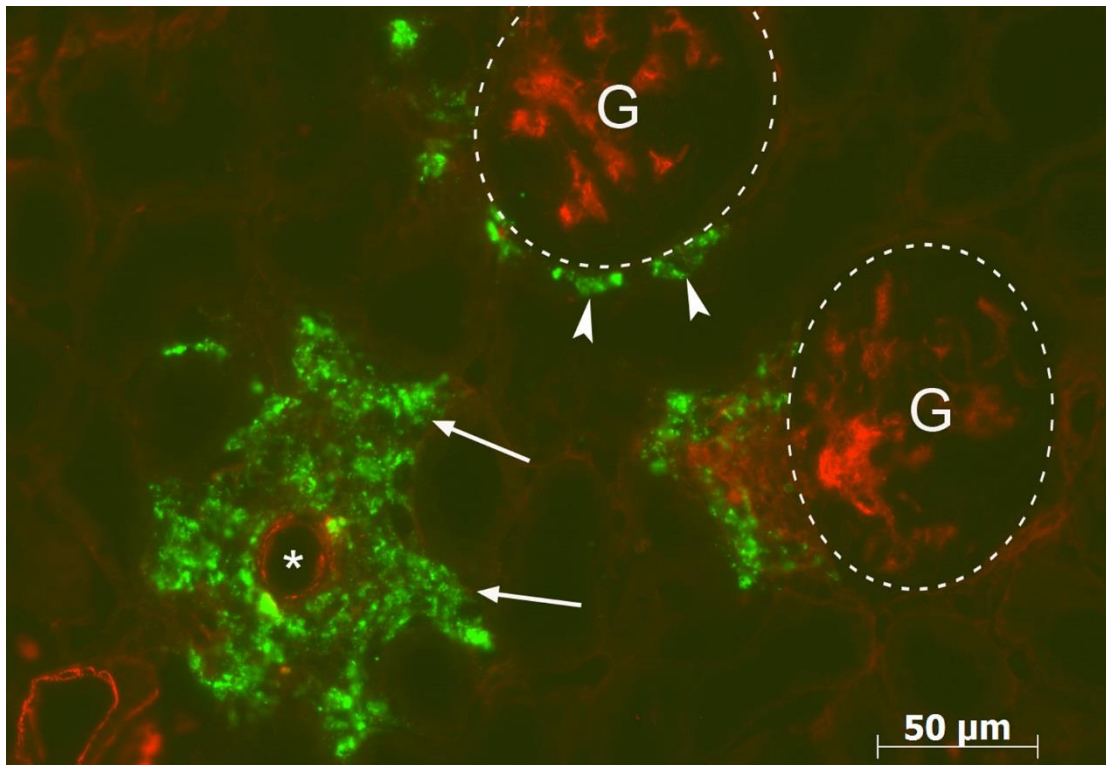


Abb. 3.37: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer **46 Wochen alten AS-Cx-/- Maus**. Renin ist grün, Glattmuskelaktin ist rot dargestellt. G=Glomerulus. 400-fache Vergrößerung. Pfeilspitzen: afferente Arteriolen. Pfeil: Reninzellen im tubulointerstitiellen Raum.

Abschließend stellt man fest, dass es bei der 46 Wochen alten AS-Cx40-/- Maus insgesamt zu einem massiven Rückgang der Reninexpression gekommen ist, wobei vor allem die inhomogene Verteilung der reninbildenden Zellen ins Auge fällt.

So sind mit Ausnahme eines reninhaltigen Glomerulus mit moderater Menge reninbildender Zellen, einige wenige Glomeruli die ein sehr hohes Reninzellaufkommen haben im Versorgungsgebiet einer Interlobulararterien vorhanden. Alle anderen Glomeruli des Gefäßbaumabschnittes sind reninfrei.

3.7.2 Die 46 Wochen alte Wildtyp-Maus

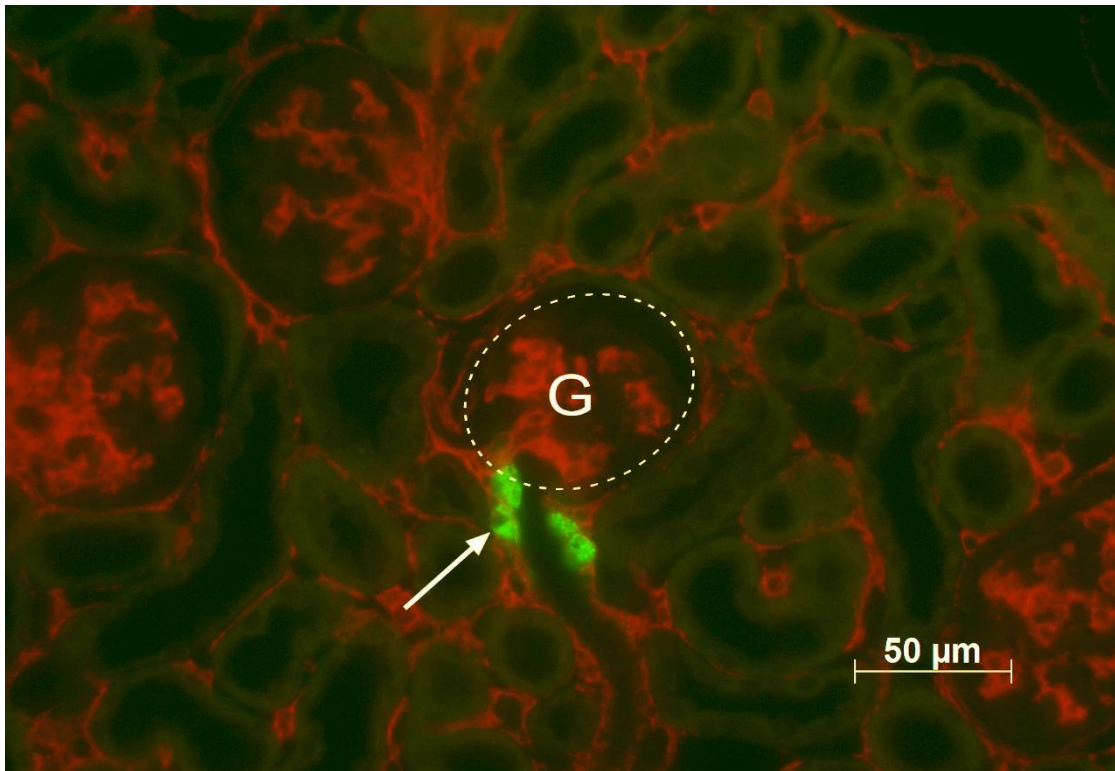


Abb. 3.38: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer **46 Wochen alten Wildtyp-Maus**. Renin ist grün, Glattmuskelaktin ist rot dargestellt. G= Glomerulus. 400-fache Vergrößerung. Pfeile: Reninzellen in der Media der afferenten Arteriole.

Während sich in den histologischen Schnittbildern der 46 Wochen alten AS-Cx40/--Maus Glomeruli ohne oder vorwiegend mit stark ausgeprägter Reninexpression finden, ist in der histologischen Darstellung (Abb. 3.38) einer 46 Wochen alten Wildtyp-Maus die Reninexpression unverändert zu den vorhergehenden Altersstufen. Es sind wenige reninbildenden Zellen am terminalen Abschnitt der afferenten Arteriole in juxtaglomerulärer Position vorhanden.

3.8 Analyse der quantitativen Reninexpression

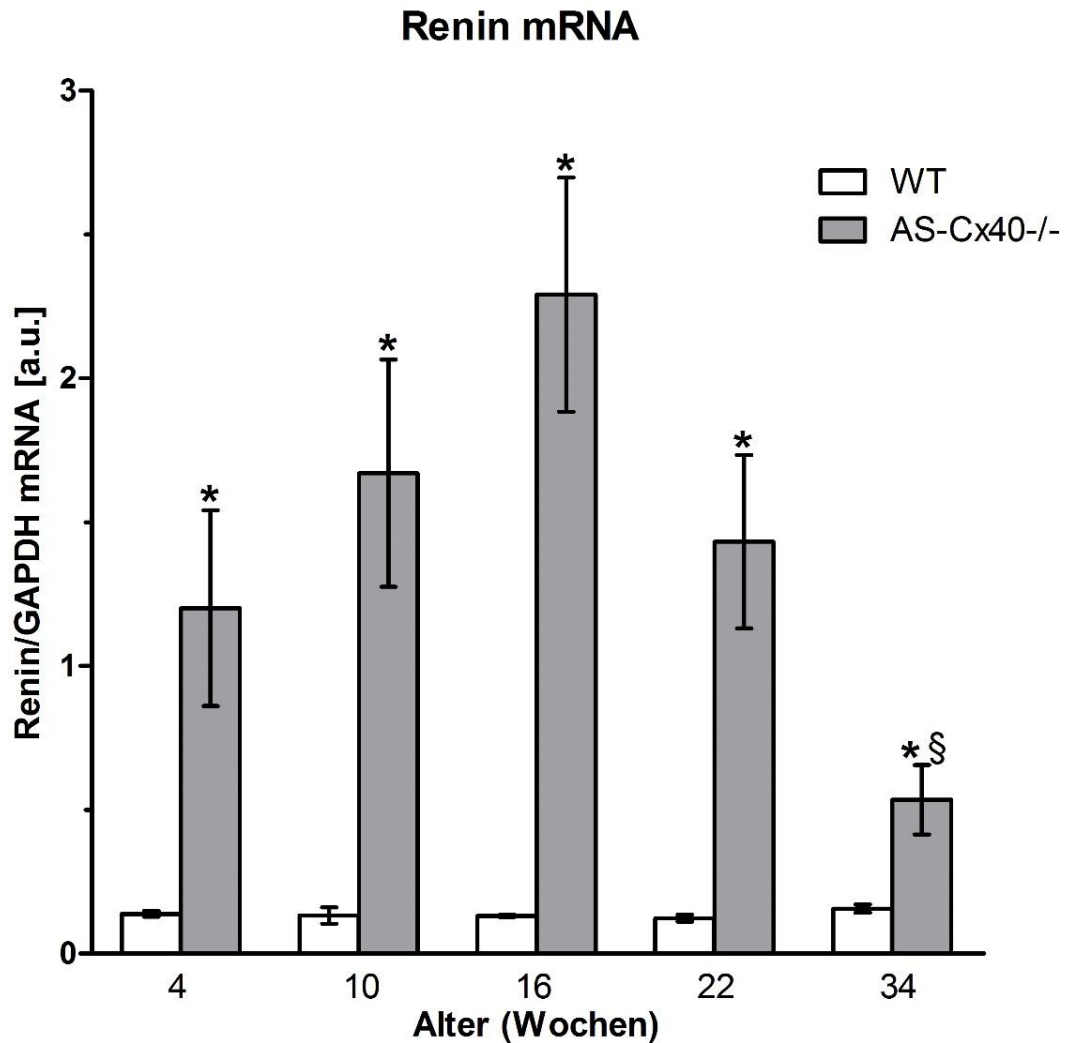


Abb 3.39: Graphische Darstellung der renalen Renin-mRNA-Level von Wildtyp- und AS-Cx40^{-/-}-Mäusen der Altersstadien 4.–34. Woche. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, (*): $p < 0.05$ gegenüber der jeweiligen Kontrollen; (§): $p < 0.05$ ggü. AS-Cx40^{-/-} 4.-22. Woche.

Neben der qualitativen Analyse der Lokalisation von Reninzellen erfolgte auch eine Bestimmung der renalen Renin-mRNA-Level in Wildtyp- und AS-Cx40^{-/-}-Mäusen der Altersstufen 4, 10, 16, 22 und 34 Wochen. Dabei wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR die Reninexpression bestimmt.

Für diese Untersuchung standen bei den 46 Wochen alten Mäusen nicht genügend Tiere zur Verfügung.

Bei den Wildtyp-Mäusen wurden nahezu konstante Werte der Renin-mRNA-Level in den verschiedenen Altersstadien gemessen (Abb. 3.39).

Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen war die Reninexpression bei den Cx40-AS-/-Mäusen im Mittel etwa 12-fach erhöht.

Innerhalb der AS-Cx40-/-Mäuse der Altersstadien 4.-22. Woche zeigte sich bei den 4 Wochen alten Mäusen der niedrigste Wert mit einer stetigen nichtsignifikanten Zunahme der Reninexpression bis zur 16 Wochen alten Maus. Bei der 22 Wochen alten Maus kommt es zu einer nicht signifikanten Abnahme im Vergleich zu den beiden vorherigen Altersstadien.

Bei den 34 Wochen alten Mäusen findet sich jedoch eine signifikante Abnahme der Werte im Vergleich zu den jüngeren Mäusen (Abb. 3.39).

4. Diskussion

In der Entwicklung der Mausniere ist die Reninexpression von der embryonalen Phase bis vier Wochen nach der Geburt in einem steten Wandel. Hierbei kommt es laufend zu Veränderungen, sowohl der Lokalisation als auch der Ausprägung von Reninzellen (Gomez et al. 1989; Sauter et al. 2008; Machura et al. 2009). Auch nach Ausreifung ist das RAAS kein starres System sondern kann sehr flexibel auf Veränderungen, die den Blutdruck beeinflussen, reagieren. Bei länger anhaltender Stimulation wird dies nicht nur über eine vermehrte Bildung von Renin sondern über eine Zunahme der Zahl von reninbildenden Zellen erreicht (Taugner et al. 1984b). Dabei vollzieht sich eine metaplastische Transformation von glatten Gefäßmuskelzellen in reninbildende Zellen (Cantin et al. 1977; Barajas 1979; Gomez et al. 1990). Dieser Prozess läuft physiologisch in retrograder Richtung an den afferenten Arteriolen von juxtaglomerulär Richtung Interlobulararterien in einem variierendem Muster (Casellas et al. 1994; Fuchs et al. 2002). Es können sich auch aber auch Perizyten und glomeruläre Mesangiumzellen wieder zu reninbildenden Zellen umwandeln (Sequeira López et al. 2004; Kurtz 2012; Gomez et al. 2014).

Einen permanenten und sehr starken Stimulus auf die Reninexpression kann man über eine Deletion einer Komponente des RAAS erreichen. Ein Knockout der Aldosteronsynthase führt zu einer Verminderung der Natrium- und Wasserrückresorption in der Niere und es kommt über ein verringertes Blutvolumen zu einem Absinken des Blutdruckes (Lee et al. 2005; Makhanova et al. 2006b). Bedingt durch die arterielle Hypotonie kommt es im Verlauf zur Bildung reninproduzierender Zellen im Bereich des juxtaglomerulären Apparates. Diese kann über eine retrograde Rekrutierung entlang der afferenten Arteriole erfolgen, aber auch über die Entwicklung einer Mehrschichtigkeit von Reninzellen juxtaglomerulär um die afferente Arteriole (Makhanova et al. 2006a; Karger 2014; Kurt et al. 2014).

Hinreichend bekannt ist, dass in der adulten Niere Connexin 40 für eine korrekte Positionierung der Reninzellen unentbehrlich ist. Bei Abwesenheit dieser Gap junctions kommt es zur Ausbildung von Reninzellen im peri- und juxtaglomerulären Interstitium, um die Bowman'sche Kapsel und im Bereich der efferenten Arteriole (Haefliger et al. 2001; Krattinger et al. 2007; Kurtz et al. 2007; Wagner et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich die bislang bekannten Erkenntnisse bezüglich Anzahl und Lokalisation reninproduzierender Zellen bei der Cx40 defizienten Maus bestätigen lassen.

Vordergründig war jedoch, ob und wenn ja, welche altersabhängigen Veränderungen der Reninexpression bei Cx40^{-/-}-Mäusen unter einer von Geburt an dauerhaften Stimulation des RAAS auftreten. Hierfür wurde durch genetische Deletion der Aldosteronsynthese ein sehr starker Reiz auf das RAAS ausgeübt, was normalerweise eine kompensatorische Mehrbildung reninproduzierender Zellen im Bereich des juxtaglomerulären Apparates bewirkt (Makhanova et al. 2006a). Anschließend sollte gezeigt werden, ob und zu welchen Veränderungen von Anzahl und Lokalisation der reninbildenden Zellen es bei einem Fehlen des Gap junction-bildenden Protein Connexin 40 in verschiedenen Alterstadien kommt.

Wie schon in früheren Untersuchungen mit AS-Knockout-Mäusen (Makhanova et al. 2006a; Kurt et al. 2014) kommt es auch bei jungen AS-Cx40^{-/-}-Mäusen zu einer deutlich gesteigerten Reninexpression. Vergleicht man das 3D-Modell der Reninexpression einer Wildtyp-Maus (Abb. 3.1.) mit dem einer AS-Cx40^{-/-}-Maus sieht man bei der Knockout-Maus eine merklich erhöhte Zahl an reninbildenden Zellen. Dieser Unterschied spiegelt sich auch in den gemessenen renalen Renin-mRNA-Werten wider, der bei AS-Cx40^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp 12-fach erhöht ist.

Mit fortschreitendem Alter kommt es bei der AS-Cx40^{-/-}-Maus zu einer ausgeprägten Veränderung der Reninexpression. Dies lässt sich sehr gut an Hand der graphischen Gegenüberstellung der 3D-Rekonstruktionen der verschiedenen Altersstadien der AS-Cx40^{-/-}-Mäuse (Abb. 4.1.) beurteilen. Dabei kommt es nach zehn Wochen zu einem Zuwachs von reninbildenden Zellen welcher sein Maximum in der 16. Woche erreicht. Diese Feststellung gewonnen an Hand der 3D-Rekonstruktionen wird durch die Arbeit von Karger (Karger 2014) bestätigt, bei der die Ausmessung der Fläche der juxtaglomerulären Reninzellfelder bei AS^{-/-}-Cx40^{-/-}-Mäusen eine altersabhängige Größenzunahme der Reninzellfelder ergab.

Diese sichtbare Zunahme an reninbildenden Zellen in den 3D-Rekonstruktionen spiegelt sich nur bedingt in den gemessenen mRNA-Werten wider. Man kann zwar einen Anstieg bis zur 16. Woche erkennen (Abb. 3.39.), jedoch liegt bei den gemessenen Werten kein signifikanter Unterschied vor. Noch deutlicher wird diese Diskrepanz wenn man die Rekonstruktionen und die Renin mRNA-Werte der 10 und der 22 Wochen alten AS-Cx40-/-Mäuse miteinander vergleicht. Hier sieht man bei den 22 Wochen alten Mäusen eine starke Zunahme der Reninexpression gegenüber den 10 Wochen alten Mäusen, während die gemessenen Reninwerte im Vergleich nahezu unverändert bleiben.

Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu früheren Untersuchungen, bei denen sich bei einer Zunahme von reninbildenden Zellen auch eine erhöhte Menge an Renin nachweisen ließ (Everett et al. 1990; Rasch et al. 1998; Machura et al. 2012).

Eine mögliche Erklärung für die deutliche Zunahme der Anzahl an reninbildenden Zellen ohne signifikante Zunahme der gemessenen Renin-Werte wäre, dass in diesen transformierten Reninzellen weniger Renin gebildet wird. Ursächlich für den Rückgang könnte das zunehmende Alter der Mäuse und der damit lange andauernden Stimulation durch die genetische Deletion sein, was eine reduzierte Reninproduktion induzieren könnte.

Nach der beschriebenen Zunahme von Reninzellen findet zwischen der 16. und 22. Woche eine rückläufige Entwicklung statt. Vergleicht man die 16 Wochen alte mit der 22 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus so wird eine leichte Verringerung der Anzahl an reninbildenden Zellen deutlich. Auch bei den mRNA-Werten kommt es zu einer parallelen, aber nicht signifikanten Abnahme.

Dieser regrediente Prozess verstärkt sich gravierend mit zunehmenden Alter. So läßt sich bei der 3D-Rekonstruktion der 34 Wochen alten Maus ein auffälliger Rückgang der Reninexpression beobachten. Dabei spiegelt sich die Abnahme in dieser Altersstufe auch in den Renin-mRNA-Wert wieder, die im Vergleich zum Durchschnitt der jüngeren Mäuse annähernd um den Faktor 3 erniedrigt sind.

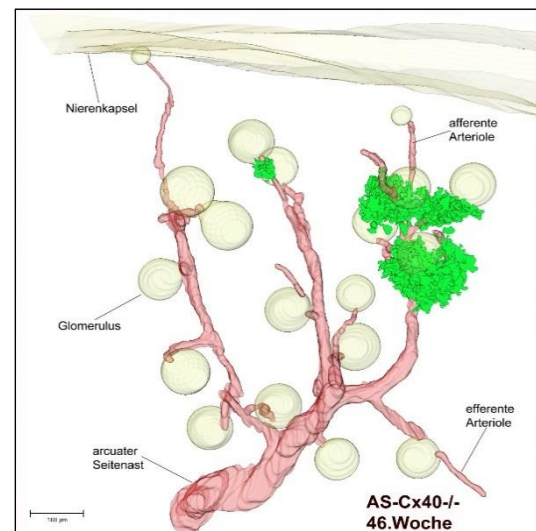
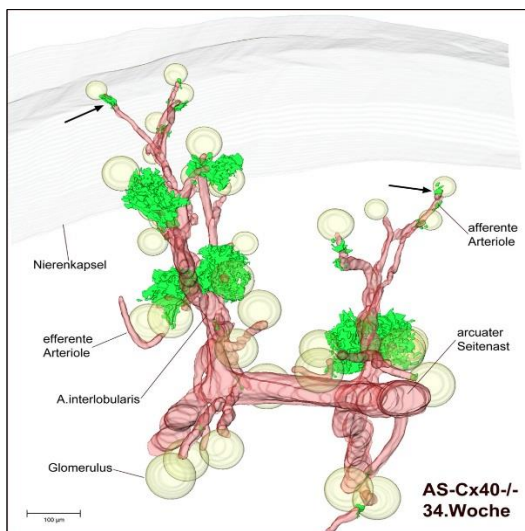
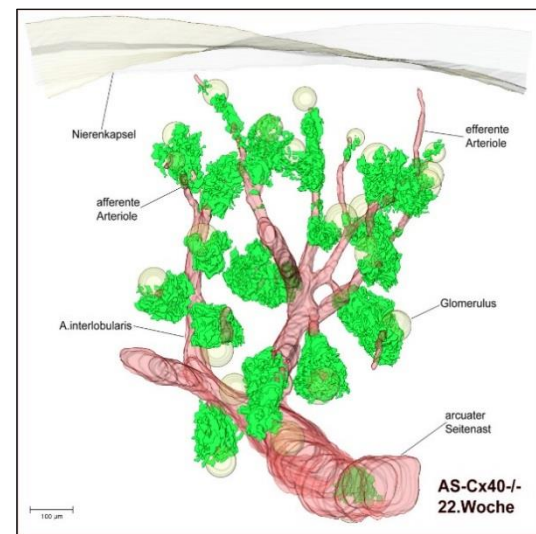
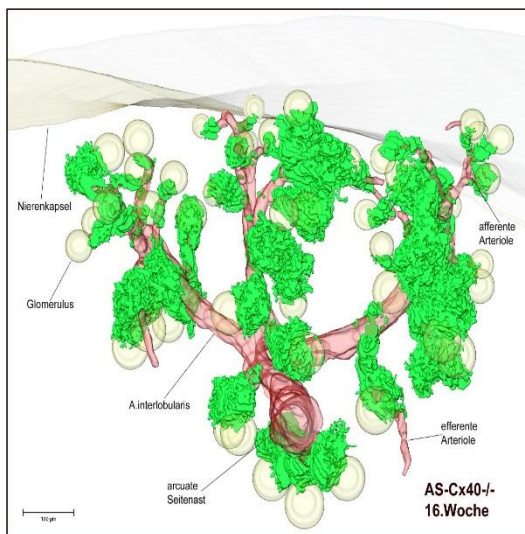
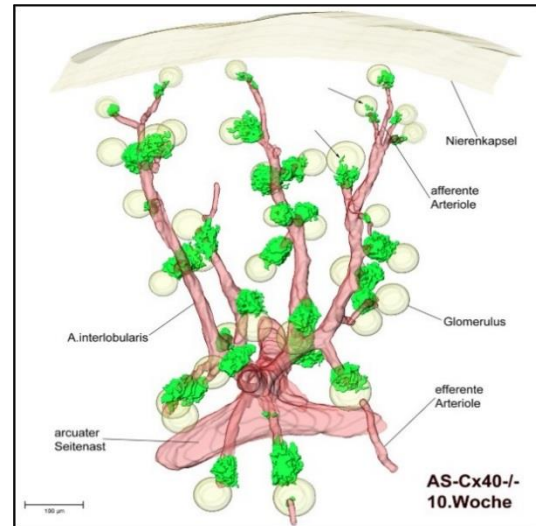
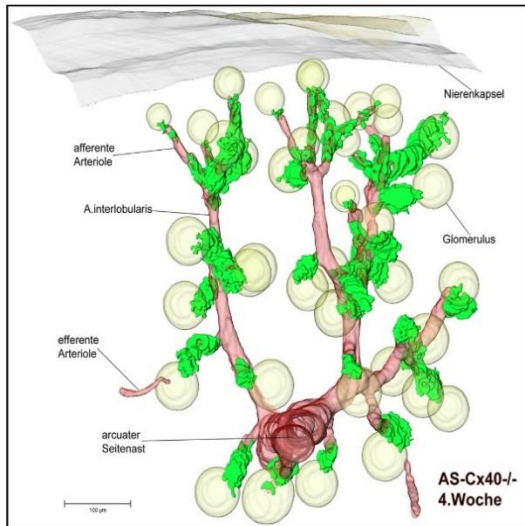


Abb. 4.1: Gegenüberstellung der 3D-Rekonstruktionen der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) der ausgewählten Gefäßbaumabschnitte mit dazugehörigen Glomeruli- und Kapselausschnitt (gelb) aller untersuchten Alterstadien der AS-Cx40-/-Mäuse nach zunehmenden Alter dargestellt. Altersangabe im Bild rechts unten.

Dieser Prozess setzt sich bei der 46 Wochen alten Maus weiter fort, bei der es zu einer weiteren erheblichen Reduzierung der Reninzellen kommt (Abb. 4.1.).

Bei Wildtyp-Mäusen fanden sich in den unterschiedlichen Altersstadien eine gleichbleibende Reninexpression. So waren in den histologischen Aufnahmen der 4 bis 46 Wochen alten Kontrollgruppen wenige reninbildenden Zellen am terminalen Abschnitt der afferenten Arteriole in juxtaglomerulärer Position zu sehen. Auch wurden bei den untersuchten Wildtyp-Mäusen nahezu konstante Werte der Renin-mRNA-Level in den verschiedenen Altersstadien gemessen. Dieses Ergebnis wird auch durch frühere Erkenntnisse bestätigt, dass bei adulten Wildtyp-Mäusen keine Veränderung hinsichtlich der Lokalisation und Anzahl reninbildender Zellen sowie der renalen Renin-mRNA-Werte in verschiedenen Altersstufen festgestellt werden konnten (Barajas und Salido 1986; Sauter et al. 2008; Karger 2014). Somit lassen sich die Veränderungen der AS-Cx40/--Mäuse nicht auf altersphysiologische Prozesse zurückführen.

Nicht nur die Anzahl reninbildender Zellen unterliegt bei zunehmendem Alter der AS-Cx40/--Mäuse einem permanenten Wandel, auch eine veränderte Verteilung an den einzelnen Glomeruli ist zu beobachten.

Bis zur 22. Woche findet sich bei den verschiedenen Alterstufen zwar eine unterschiedliche Ausprägung, jedoch ein relativ homogenes Bild der Verteilung der reninbildenden Zellen. So lässt sich eine Zweiteilung von juxtamedullären und superfiziellen Glomeruli ausmachen, bei der sich superfiziell eine insgesamt geringere Anzahl von Reninzellen als juxtamedullär findet, es ist dabei jedoch in den verschiedenen Altersstufen ein ähnliches Verhältnis gegeben.

Zu einer gänzlich veränderten Verteilung kommt es ab der 34. Woche. Generell ist ein merklicher Rückgang zu sehen, wobei sich die Abnahme sehr heterogen darstellt. So sind an einigen Glomeruli ähnlich viele Reninzellen wie in der vorherigen Altersstufe, an einigen Glomeruli sehr wenige und auch teilweise keine reninbildenden Zellen mehr zu finden. Eine noch drastischere Verminderung und auffällig verändertes Expressionsmuster zeigt sich bei den 46. Wochen alten Mäusen. In diesem Altersstadium ist der Großteil der Glomeruli reninfrei und nur noch an einigen wenigen sind reninbildende Zellen

vorhanden, dann jedoch zumeist in der sehr starken Ausprägung wie bei den mittleren Altersstufen.

Welcher Mechanismus dazu führt, dass bei einem Großteil der Glomeruli die Reninproduktion vollständig eingestellt ist und einige wenige Glomeruli weiterhin eine übersteigerte Reninexpression aufweisen, ist nicht bekannt. Auch lässt sich nicht sagen inwieweit und ob es hier zu einer Dedifferenzierung vormals reninbildender Zellen gekommen ist. Bekannt ist, dass bei längerer Suppression des RAAS wie es etwa bei Bluthochdruck oder einer Hochsalzdiät der Fall ist, eine Umwandlung von reninbildenden Zelle zu Glattmuskelzellen stattfindet (Kurtz 1989; Sequeira Lopez et al. 2001).

Ein solches inhomogenes Muster der Reninexpression von Cx40-Knockout-Mäusen wurde schon von Kurtz et al. (2007) beschrieben.

Was die Ursache für diese heterogenen Verteilung der Reninzellen mit zunehmendem Alter ist, bleibt bislang völlig unklar.

Neben diesen vorher beschriebenen Änderungen der Ausprägung und Verteilung der Reninexpression, kam es in den verschiedenen Altersstadien auch zu einer veränderten Lokalisation der Reninzellen.

Bei der 4 und 10 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus waren die Reninzellen auf einen perivaskulären Bereich um die afferente Arteriole (s. Abb. 3.6) beschränkt. Mit zunehmendem Alter, was auch mit einer zunehmenden Reninexpression einherging, kam es zu einer Ausbreitung sowohl ins Interstitium als auch den periglomerulären Bereich und der Region der efferenten Arteriole. Dieser Zuwachs war bei einigen Glomeruli so stark ausgeprägt, dass die Bowman'sche Kapsel regelrecht von Reninzellen umhüllt ist (s. Abb. 3.24).

Das Auftreten von reninbildenden Zellen im Interstitium fand sich auch bei den älteren Altersstadien, bei denen es insgesamt zu einem Rückgang der Reninexpression gekommen ist. Bei den Glomeruli mit vorhandener Reninexpression kommt es dabei noch zu einer Zunahme der Ausbreitung ins Interstitium (s. Abb. 3.37).

Dieses Vorkommen von Reninzellen in ektopischer Lage im Bereich um die Bowman'schen Kapsel, der efferenten Arteriole und des periglomerulären Interstitium sind charakteristisch bei Verlust von Cx40 (Kurtz et al. 2007; Wagner et al. 2010). Eine Lokalisation von reninbildenden Zellen im Glomerulus, wie sie dabei auch beschrieben wurde, fand sich bei der AS-Cx40^{-/-}-Maus nicht.

Jene typische Dislokation von Reninzellen bei Absenz von Cx40 zeigt sich nicht bei alleinigem Verlust der Aldosteronsynthese. Bei AS-defizienten Mäusen kommt es zu einer ausgeprägten Zunahme der Reninexpression, jedoch im Sinne einer retrograden Rekrutierung entlang der afferenten Arteriole und zur Ausbildung einer Mehrschichtigkeit von Reninzellen juxtaglomerulär um die afferente Arteriole (Makhanova et al. 2006a; Karger 2014).

Entgegen der Beobachtung vom Fehlen reninbildender Zellen in der Media der afferenten Arteriolen in normaler Lage bei Cx40 Knockout-Mäusen (Kurtz et al. 2007), waren bei der AS-Cx40^{-/-}-Maus auch reninbildende Zellen in juxtaglomerulärer Position in der Media der afferenten Arteriole zu finden. Auch von Müller (Müller 2014) wurde gezeigt, dass ein Fehlen von Cx40 nicht generell eine Lokalisation von Reninzellen in der Gefäßwand der afferenten Arteriole verhindert. Dabei wurde über Deletion des AT_{1a}-Rezeptors ebenfalls eine dauerhafte Stimulation des RAAS bei Cx40-Knockout-Mäusen erreicht. Eine Erklärung hierfür ist die starke und dauerhafte Stimulation durch die Deletion einer Komponente des RAAS wodurch glatten Muskelzellen zur Renin-produktion angeregt werden (Sugaya et al. 1995; Nagata et al. 1996; Hilgers et al. 1997; Oliverio et al. 1998).

Abschließend lässt sich feststellen, dass Cx40 notwendig für eine korrekte Lokalisation ist, jedoch keine zwingende Notwendigkeit für die Positionierung in der Media der Gefäßwand. Des weiteren hat sich gezeigt, dass es bei AS-Cx40^{-/-}-Mäusen mit zunehmendem Alter zu sehr ausgeprägten Veränderungen der Reninexpression kommt deren Ursache noch nicht bekannt ist und Gegenstand weiterer Forschung sein sollte.

5. Zusammenfassung

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System der Niere spielt eine wichtige Rolle bei der Blutdruckregulation. Dabei stellt die Reninexpression ein sehr plastisches System dar. Eine Möglichkeit des Organismus auf über längere Zeit bestehende Einflüsse zu reagieren und eine adäquate Blutdruckregulation zu gewährleisten ist die Anpassung der Zahl reninbildender Zellen. Hierbei wird ein Mehrbedarf physiologisch über eine retrograde Rekrutierung kompensiert, wobei eine Differenzierung glatter Muskelzellen der afferenten Arteriolen in Reninzellen stattfindet.

Ein entscheidende Bedingung für die physiologische Lage der reninproduzierenden Zellen in der Media der präglomerulären Gefäßen ist das Transmembranprotein Connexin 40.

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen auf Anzahl und Lokalisation reninproduzierender Zellen bei der Cx40 defizienten Maus untersucht, bei der über eine Gendelektion der Aldosteronsynthase das RAAS von Geburt an dauerhaft stimuliert ist. Darüber hinaus sollte die altersabhängige Entwicklung der Reninexpression bei Aldosteronsynthase-Connexin 40-Doppel-Knockout-Mäusen (AS-Cx40^{-/-}-Mäuse) untersucht werden.

Sowohl in den angefertigten 3 D-Rekonstruktionen als auch in den histologischen Schnittbilder zeigte sich bei jungen AS-Cx40^{-/-}-Mäusen eine deutlich gesteigerte Reninexpression gegenüber gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen. Auch bei den gemessenen renalen Renin-mRNA-Werten spiegelte sich dieser Unterschied wider, die bei AS-Cx40^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht sind. Mit fortschreitendem Alter kommt es zu einer ausgeprägten Veränderung der Reninexpression. So findet zunächst ein Zuwachs von reninbildenden Zellen statt, welcher sein Maximum in der 16. Woche erreicht. Bei der 22 Wochen alten AS-Cx40^{-/-}-Maus kommt es zu einer leichten Verringerung der Anzahl an reninbildenden Zellen. Dieser regrediente Prozess verstärkt sich gravierend mit zunehmenden Alter. Bei der 34 Wochen alten Maus läßt sich ein auffälliger Rückgang der Reninexpression beobachten. Dieser Prozess setzt sich bei der 46 Wochen alten Maus weiter fort, bei der es zu einer weiteren erheblichen Reduzierung der Reninzellen kommt. Auffällig hierbei ist, dass an einem Großteil der Glomeruli keine Reninsignale vorhanden sind.

Dieser Verlauf zeigt sich auch in den Werten der Renin-mRNA-Level, mit einer nicht signifikanten Zunahme der Reninexpression bei den jüngeren und einer nicht signifikanten Abnahme bei den älteren Tieren. Nur bei den 34 Wochen alten Mäusen findet sich eine signifikante Abnahme der Werte im Vergleich zu den jüngeren Mäusen.

Bei der Kontrollgruppe der Wildtyp-Mäuse fand sich in den unterschiedlichen Altersstadien eine gleichbleibende Reninexpression. Auch wurden bei den untersuchten Wildtyp-Mäusen nahezu konstante Werte der Renin-mRNA-Level in den verschiedenen Altersstadien gemessen.

In den unterschiedlichen Altersstadien der AS-Cx40^{-/-}-Mäuse kam es auch zu einer veränderten Lokalisation der Reninzellen. Während bei den jüngeren Tieren die Reninzellen auf den perivaskulären Bereich um die afferente Arteriole beschränkt waren, kam es mit zunehmendem Alter zu einer Ausbreitung sowohl ins Interstitium als auch den periglomerulären Bereich und der Region der efferenten Arteriole, teilweise war die Bowman'sche Kapsel regelrecht von Reninzellen umhüllt.

Dieses Auftreten von Reninzellen in ektopischer Lage im Bereich um die Bowman'schen Kapsel, der efferenten Arteriole und des periglomerulären Interstitium sind charakteristisch bei Verlust von Cx40.

Während bei Cx40 Knockout-Mäusen keine Reninzellen in der Media der afferenten Arteriolen in normaler Lage vorhanden sind, waren bei der AS-Cx40^{-/-}-Maus auch reninbildende Zellen in juxtaglomerulärer Position in der Media der afferenten Arteriole zu finden. Wofür die starke und dauerhafte Stimulation durch die Deletion einer Komponente des RAAS eine mögliche Erklärung ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Cx40 notwendig für eine korrekte Lokalisation der Reninzellen ist, jedoch keine zwingende Notwendigkeit für die Positionierung in der Media der Gefäßwand. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass es bei AS-Cx40^{-/-}-Mäusen mit zunehmendem Alter zu sehr ausgeprägten Veränderungen der Reninexpression kommt.

6. Literaturverzeichnis

Arensbak, B.; Mikkelsen, H. B.; Gustafsson, F.; Christensen, T.; Holstein-Rathlou, N. H. (2001): Expression of connexin 37, 40, and 43 mRNA and protein in renal preglomerular arterioles. In: *Histochemistry and cell biology* 115 (6), S. 479–487.

Barajas, L. (1979): Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. In: *The American journal of physiology* 237 (5), S. F333-43.

Barajas, L.; Salido, E. (1986): Juxtaglomerular apparatus and the renin-angiotensin system. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 54 (4), S. 361–364.

Boon, W. C.; Coghlan, J. P.; Curnow, K. M.; McDougall, J. G. (1997a): Aldosterone secretion: a molecular perspective. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 8 (9), S. 346–354.

Boon, W. C.; Coghlan, J. P.; Curnow, K. M.; McDougall, J. G. (1997b): Aldosterone secretion: a molecular perspective. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 8 (9), S. 346–354.

Bruzzone, R.; White, T. W.; Goodenough, D. A. (1996): The cellular Internet: on-line with connexins. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 18 (9), S. 709–718. DOI: 10.1002/bies.950180906.

Bumpus, F. M.; Catt, K. J.; Chiu, A. T.; DeGasparo, M.; Goodfriend, T.; Husain, A. et al. (1991): Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. In: *Hypertension* 17 (5), S. 720–721.

Cantin, M.; Araujo-Nascimento, M. D.; Benchimol, S.; Desormeaux, Y. (1977): Metaplasia of smooth muscle cells into juxtaglomerular cells in the juxtaglomerular apparatus, arteries, and arterioles of the ischemic (endocrine) kidney. An ultrastructural-cytochemical and autoradiographic study. In: *The American journal of pathology* 87 (3), S. 581–602.

- Cascio, M.; Kumar, N. M.; Safarik, R.; Gilula, N. B. (1995):** Physical characterization of gap junction membrane connexons (hemi-channels) isolated from rat liver. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (31), S. 18643–18648.
- Casellas, D.; Dupont, M.; Bouriquet, N.; Moore, L. C.; Artuso, A.; Mimran, A. (1994):** Anatomic pairing of afferent arterioles and renin cell distribution in rat kidneys. In: *The American journal of physiology* 267 (6 Pt 2), S. F931-6.
- Castrop, Hayo; Höcherl, Klaus; Kurtz, Armin; Schweda, Frank; Todorov, Vladimir; Wagner, Charlotte (2010):** Physiology of kidney renin. In: *Physiological reviews* 90 (2), S. 607–673. DOI: 10.1152/physrev.00011.2009.
- Catanzaro, D. F.; Mullins, J. J.; Morris, B. J. (1983):** The biosynthetic pathway of renin in mouse submandibular gland. In: *The Journal of biological chemistry* 258 (12), S. 7364–7368.
- Chen, S. Y.; Bhargava, A.; Mastroberardino, L.; Meijer, O. C.; Wang, J.; Buse, P. et al. (1999):** Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (5), S. 2514–2519.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987):** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Analytical biochemistry* 162 (1), S. 156–159. DOI: 10.1006/abio.1987.9999.
- Curnow, K. M.; Tusie-Luna, M. T.; Pascoe, L.; Natarajan, R.; Gu, J. L.; Nadler, J. L.; White, P. C. (1991):** The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 5 (10), S. 1513–1522. DOI: 10.1210/mend-5-10-1513.
- Dahl, G.; Werner, R.; Levine, E.; Rabadan-Diehl, C. (1992):** Mutational analysis of gap junction formation. In: *Biophysical journal* 62 (1), S. 172-80; discussion 180-2. DOI: 10.1016/S0006-3495(92)81803-9.
- Dzau, V. J.; Tanaka, A.; Pratt, R. E. (1982):** The nature of renin precursor and inactive renin. In: *Clinical and experimental hypertension. Part A, Theory and practice* 4 (11-12), S. 1973–1985.

Everett, A. D.; Carey, R. M.; Chevalier, R. L.; Peach, M. J.; Gomez, R. A. (1990): Renin release and gene expression in intact rat kidney microvessels and single cells. In: *The Journal of clinical investigation* 86 (1), S. 169–175. DOI: 10.1172/JCI114680.

Fuchs, Sébastien; Germain, Stéphane; Philippe, Josette; Corvol, Pierre; Pinet, Florence (2002): Expression of renin in large arteries outside the kidney revealed by human renin promoter/LacZ transgenic mouse. In: *The American journal of pathology* 161 (2), S. 717–725. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64227-7.

Gasparo, M. de; Catt, K. J.; Inagami, T.; Wright, J. W.; Unger, T. (2000): International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. In: *Pharmacological reviews* 52 (3), S. 415–472.

Geibel, J.; Giebisch, G.; Boron, W. F. (1990): Angiotensin II stimulates both Na(+)-H⁺ exchange and Na⁺/HCO₃⁻ cotransport in the rabbit proximal tubule. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (20), S. 7917–7920.

Goldblatt, H.; Haas, E.; Klick, R. L.; Lewis, L. V. (1976): The effect of main artery occlusion of one kidney on blood pressure of dogs. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (5), S. 1722–1724.

Gomez, R. A.; Chevalier, R. L.; Everett, A. D.; Elwood, J. P.; Peach, M. J.; Lynch, K. R.; Carey, R. M. (1990): Recruitment of renin gene-expressing cells in adult rat kidneys. In: *The American journal of physiology* 259 (4 Pt 2), S. F660-5.

Gomez, R. A.; Lynch, K. R.; Sturgill, B. C.; Elwood, J. P.; Chevalier, R. L.; Carey, R. M.; Peach, M. J. (1989): Distribution of renin mRNA and its protein in the developing kidney. In: *The American journal of physiology* 257 (5 Pt 2), S. F850-8.

Gomez, R. Ariel; Belyea, Brian; Medrano, Silvia; Pentz, Ellen S.; Sequeira-Lopez, Maria Luisa S (2014): Fate and plasticity of renin precursors in development and disease. In: *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 29 (4), S. 721–726. DOI: 10.1007/s00467-013-2688-0.

Goormaghtigh, N. (1937): L'appareil neuromyo-arteriel juxtaglomerulaire du rein; ses reactions en pathologie et ses rapports avec le tube urinifere. In: *C R Soc Biol* 124:, S. 293–296.

Grady, E. F.; Sechi, L. A.; Griffin, C. A.; Schambelan, M.; Kalinyak, J. E. (1991): Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. In: *The Journal of clinical investigation* 88 (3), S. 921–933. DOI: 10.1172/JCI115395.

Hackenthal, E.; Paul, M.; Ganten, D.; Taugner, R. (1990): Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. In: *Physiological reviews* 70 (4), S. 1067–1116.

Hackenthal, E.; Taugner, R. (1986): Hormonal signals and intracellular messengers for renin secretion. In: *Molecular and cellular endocrinology* 47 (1-2), S. 1–12.

Haefliger, J. A.; Demotz, S.; Braissant, O.; Suter, E.; Waeber, B.; Nicod, P.; Meda, P. (2001): Connexins 40 and 43 are differentially regulated within the kidneys of rats with renovascular hypertension. In: *Kidney international* 60 (1), S. 190–201. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2001.00786.x.

Haefliger, Jacques-Antoine; Krattinger, Nathalie; Martin, David; Pedrazzini, Thierry; Capponi, Alessandro; Döring, Britta et al. (2006): Connexin43-dependent mechanism modulates renin secretion and hypertension. In: *The Journal of clinical investigation* 116 (2), S. 405–413. DOI: 10.1172/JCI23327.

Hanner, Fiona; Maltzahn, Julia von; Maxeiner, Stephan; Toma, Ildiko; Sipos, Arnold; Krüger, Olaf et al. (2008): Connexin45 is expressed in the juxtaglomerular apparatus and is involved in the regulation of renin secretion and blood pressure. In: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 295 (2), S. R371-80. DOI: 10.1152/ajpregu.00468.2007.

Hilgers, K. F.; Reddi, V.; Kregge, J. H.; Smithies, O.; Gomez, R. A. (1997): Aberrant renal vascular morphology and renin expression in mutant mice lacking angiotensin-converting enzyme. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 29 (1 Pt 2), S. 216–221.

- Holmer, S. R.; Kaissling, B.; Putnik, K.; Pfeifer, M.; Krämer, B. K.; Riegger, G. A.; Kurtz, A. (1997):** Beta-adrenergic stimulation of renin expression in vivo. In: *Journal of hypertension* 15 (12 Pt 1), S. 1471–1479.
- Karger, Christian (2014):** Charakterisierung Renin-produzierender Zellen in der Aldosteronsynthese-defizienten Maus.
- Krattinger, N.; Capponi, A.; Mazzolai, L.; Aubert, J-F; Caille, D.; Nicod, P. et al. (2007):** Connexin40 regulates renin production and blood pressure. In: *Kidney international* 72 (7), S. 814–822. DOI: 10.1038/sj.ki.5002423.
- Kumar, N. M.; Gilula, N. B. (1996):** The gap junction communication channel. In: *Cell* 84 (3), S. 381–388.
- Kurt, Birgül; Karger, Christian; Wagner, Charlotte; Kurtz, Armin (2014):** Control of renin secretion from kidneys with renin cell hyperplasia. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 306 (3), S. F327-32. DOI: 10.1152/ajprenal.00536.2013.
- Kurtz, A. (1989):** Cellular control of renin secretion. In: *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 113, S. 1–40.
- Kurtz, A.; Wagner, C. (1999):** Cellular control of renin secretion. In: *The Journal of experimental biology* 202 (Pt 3), S. 219–225.
- Kurtz, Armin (2012):** Control of renin synthesis and secretion. In: *American journal of hypertension* 25 (8), S. 839–847. DOI: 10.1038/ajh.2011.246.
- Kurtz, Lisa; Janssen-Bienhold, Ulrike; Kurtz, Armin; Wagner, Charlotte (2009):** Connexin expression in renin-producing cells. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 20 (3), S. 506–512. DOI: 10.1681/ASN.2008030252.
- Kurtz, Lisa; Schweda, Frank; Wit, Cor de; Kriz, Wilhelm; Witzgall, Ralph; Warth, Richard et al. (2007):** Lack of connexin 40 causes displacement of renin-producing cells from afferent arterioles to the extraglomerular mesangium. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18 (4), S. 1103–1111. DOI: 10.1681/ASN.2006090953.

Lavoie, Julie L.; Cassell, Martin D.; Gross, Kenneth W.; Sigmund, Curt D. (2004): Localization of renin expressing cells in the brain, by use of a REN-eGFP transgenic model. In: *Physiological genomics* 16 (2), S. 240–246. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00131.2003.

Le Moëllic, C.; Cluzeaud, F.; Fay, M.; Blot-Chabaud, M. (2004): The early non-genomic aldosterone-induced increase in sodium transport is a membrane-initiated event that requires protein carboxyl methylation in renal cells. In: *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 50 (7), S. 833–840.

Lee, Gene; Makhanova, Natalia; Caron, Kathleen; Lopez, Maria L Sequeira; Gomez, R. Ariel; Smithies, Oliver; Kim, Hyung-Suk (2005): Homeostatic responses in the adrenal cortex to the absence of aldosterone in mice. In: *Endocrinology* 146 (6), S. 2650–2656. DOI: 10.1210/en.2004-1102.

Leung, Po Sing; Chappell, Mark C. (2003): A local pancreatic renin-angiotensin system: endocrine and exocrine roles. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 35 (6), S. 838–846.

Levens, N. R.; Peach, M. J.; Carey, R. M. (1981): Role of the intrarenal renin-angiotensin system in the control of renal function. In: *Circulation research* 48 (2), S. 157–167.

Lieberman, S.; Greenfield, N. J.; Wolfson, A. (1984): A heuristic proposal for understanding steroidogenic processes. In: *Endocrine reviews* 5 (1), S. 128–148. DOI: 10.1210/edrv-5-1-128.

Machura, Katharina; Neubauer, Björn; Steppan, Dominik; Kettl, Ramona; Groß, Andreas; Kurtz, Armin (2012): Role of blood pressure in mediating the influence of salt intake on renin expression in the kidney. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 302 (10), S. F1278-85. DOI: 10.1152/ajprenal.00688.2011.

Machura, Katharina; Steppan, Dominik; Neubauer, Bjoern; Alenina, Natalia; Coffman, Thomas M.; Facemire, Carrie S. et al. (2009): Developmental renin expression in mice with a defective renin-angiotensin system. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 297 (5), S. F1371-80. DOI: 10.1152/ajprenal.00378.2009.

Makhanova, Natalia; Lee, Gene; Takahashi, Nobuyuki; Sequeira Lopez, Maria L; Gomez, R. Ariel; Kim, Hyung-Suk; Smithies, Oliver (2006a):

Kidney function in mice lacking aldosterone. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 290 (1), S. F61-9. DOI:

10.1152/ajprenal.00257.2005.

Makhanova, Natalia; Sequeira-Lopez, Maria L S; Gomez, R. Ariel; Kim, Hyung-Suk; Smithies, Oliver (2006b): Disturbed homeostasis in sodium-restricted mice heterozygous and homozygous for aldosterone synthase gene disruption. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 48 (6), S. 1151–1159. DOI: 10.1161/01.HYP.0000249902.09036.e7.

Moffett, R. B.; McGowan, R. A.; Gross, K. W. (1986): Modulation of kidney renin messenger RNA levels during experimentally induced hypertension. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 8 (10), S. 874–882.

Müller, Hanna (2014): Reninexpression in der Angiotensin II-AT 1a - Rezeptor- und Connexin 40- Doppel-Knockout-Maus.

Nagata, M.; Tanimoto, K.; Fukamizu, A.; Kon, Y.; Sugiyama, F.; Yagami, K. et al. (1996): Nephrogenesis and renovascular development in angiotensinogen-deficient mice. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 75 (5), S. 745–753.

Náray-Fejes-Tóth, A.; Fejes-Tóth, G. (2000): The sgk, an aldosterone-induced gene in mineralocorticoid target cells, regulates the epithelial sodium channel. In: *Kidney international* 57 (4), S. 1290–1294. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2000.00964.x.

Ogishima, T.; Suzuki, H.; Hata, J.; Mitani, F.; Ishimura, Y. (1992): Zone-specific expression of aldosterone synthase cytochrome P-450 and cytochrome P-45011 beta in rat adrenal cortex: histochemical basis for the functional zonation. In: *Endocrinology* 130 (5), S. 2971–2977. DOI: 10.1210/endo.130.5.1572304.

Ohnishi, T.; Wada, A.; Lauber, M.; Yamano, T.; Okamoto, M. (1988): Aldosterone biosynthesis in mitochondria of isolated zones of adrenal cortex. In: *Journal of steroid biochemistry* 31 (1), S. 73–81.

- Oliverio, M. I.; Madsen, K.; Best, C. F.; Ito, M.; Maeda, N.; Smithies, O.; Coffman, T. M. (1998):** Renal growth and development in mice lacking AT1A receptors for angiotensin II. In: *The American journal of physiology* 274 (1 Pt 2), S. F43-50.
- Peters, Jörg; Clausmeyer, Susanne (2002):** Intracellular sorting of renin: cell type specific differences and their consequences. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 34 (12), S. 1561–1568.
- Pitts, J. D.; Simms, J. W. (1977):** Permeability of junctions between animal cells. Intercellular transfer of nucleotides but not of macromolecules. In: *Experimental cell research* 104 (1), S. 153–163.
- Pratt, R. E.; Ouellette, A. J.; Dzau, V. J. (1983):** Biosynthesis of renin: multiplicity of active and intermediate forms. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (22), S. 6809–6813.
- Rasch, R.; Jensen, B. L.; Nyengaard, J. R.; Skøtt, O. (1998):** Quantitative changes in rat renin secretory granules after acute and chronic stimulation of the renin system. In: *Cell and tissue research* 292 (3), S. 563–571.
- Revel, J. P.; Karnovsky, M. J. (1967):** Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. In: *The Journal of cell biology* 33 (3), S. C7-C12.
- Sauter, A.; Machura, K.; Neubauer, B.; Kurtz, A.; Wagner, C. (2008):** Development of renin expression in the mouse kidney. In: *Kidney international* 73 (1), S. 43–51. DOI: 10.1038/sj.ki.5002571.
- Schnermann, J. (1998):** Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. In: *The American journal of physiology* 274 (2 Pt 2), S. R263-79.
- Sequeira Lopez, M L; Pentz, E. S.; Robert, B.; Abrahamson, D. R.; Gomez, R. A. (2001):** Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 281 (2), S. F345-56.

- Sequeira López, Maria Luisa S; Pentz, Ellen S.; Nomasa, Takayo; Smithies, Oliver; Gomez, R. Ariel (2004):** Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to the renin phenotype when homeostasis is threatened. In: *Developmental cell* 6 (5), S. 719–728.
- Simpson, I.; Rose, B.; Loewenstein, W. R. (1977):** Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. In: *Science (New York, N.Y.)* 195 (4275), S. 294–296.
- Söhl, Goran; Willecke, Klaus (2004):** Gap junctions and the connexin protein family. In: *Cardiovascular research* 62 (2), S. 228–232. DOI: 10.1016/j.cardiores.2003.11.013.
- Sugaya, T.; Nishimatsu, S.; Tanimoto, K.; Takimoto, E.; Yamagishi, T.; Imamura, K. et al. (1995):** Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice with hypotension and hyperreninemia. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (32), S. 18719–18722.
- Takenaka, T.; Inoue, T.; Kanno, Y.; Okada, H.; Meaney, K. R.; Hill, C. E.; Suzuki, H. (2008):** Expression and role of connexins in the rat renal vasculature. In: *Kidney international* 73 (4), S. 415–422. DOI: 10.1038/sj.ki.5002673.
- Taugner, C.; Poulsen, K.; Hackenthal, E.; Taugner, R. (1979):** Immunocytochemical localization of renin in mouse kidney. In: *Histochemistry* 62 (1), S. 19–27.
- Taugner, R.; Bührle, C. P.; Hackenthal, E.; Mannek, E.; Nobiling, R. (1984a):** Morphology of the juxtaglomerular apparatus and secretory mechanisms. In: *Contributions to nephrology* 43, S. 76–101.
- Taugner, R.; Bührle, C. P.; Nobiling, R. (1984b):** Ultrastructural changes associated with renin secretion from the juxtaglomerular apparatus of mice. In: *Cell and tissue research* 237 (3), S. 459–472.
- Taugner, R.; Kim, S. J.; Murakami, K.; Waldherr, R. (1987):** The fate of prorenin during granulopoiesis in epithelioid cells. Immunocytochemical experiments with antisera against renin and different portions of the renin prosegment. In: *Histochemistry* 86 (3), S. 249–253.

Touyz, Rhian M. (2003): The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension. In: *Current hypertension reports* 5 (2), S. 155–164.

Unger, T.; Chung, O.; Csikos, T.; Culman, J.; Gallinat, S.; Gohlke, P. et al. (1996): Angiotensin receptors. In: *Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension* 14 (5), S. S95-103.

Vander, A. J. (1967): Control of renin release. In: *Physiological reviews* 47 (3), S. 359–382.

Wagner, Charlotte; Jobs, Alexander; Schweda, Frank; Kurtz, Lisa; Kurt, Birguel; Lopez, Maria L Sequeira et al. (2010): Selective deletion of Connexin 40 in renin-producing cells impairs renal baroreceptor function and is associated with arterial hypertension. In: *Kidney international* 78 (8), S. 762–768. DOI: 10.1038/ki.2010.257.

Wagner, Charlotte; Kurtz, Lisa; Schweda, Frank; Simon, Alexander M.; Kurtz, Armin (2009): Connexin 37 is dispensable for the control of the renin system and for positioning of renin-producing cells in the kidney. In: *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 459 (1), S. 151–158. DOI: 10.1007/s00424-009-0707-6.

Wagner, Charlotte; Wit, Cor de; Kurtz, Lisa; Grünberger, Christian; Kurtz, Armin; Schweda, Frank (2007): Connexin40 is essential for the pressure control of renin synthesis and secretion. In: *Circulation research* 100 (4), S. 556–563. DOI: 10.1161/01.RES.0000258856.19922.45.

Wald, H. (1999): Regulation of the ROMK potassium channel in the kidney. In: *Experimental nephrology* 7 (3), S. 201–206.

White, P. C.; Pascoe, L.; Curnow, K. M.; Tannin, G.; Rösler, A. (1992): Molecular biology of 11 β -hydroxylase and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes. In: *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 43 (8), S. 827–835. DOI: 10.1016/0960-0760(92)90309-7.

Yabu, M.; Senda, T.; Nonaka, Y.; Matsukawa, N.; Okamoto, M.; Fujita, H. (1991): Localization of the gene transcripts of 11 beta-hydroxylase and aldosterone synthase in the rat adrenal cortex by in situ hybridization. In: *Histochemistry* 96 (5), S. 391–394.

Zhang, Jianhong; Hill, Caryl E. (2005): Differential connexin expression in preglomerular and postglomerular vasculature: accentuation during diabetes. In: *Kidney international* 68 (3), S. 1171–1185. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.00509.x.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Signalkaskade des RAAS.

Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Biosynthese von Aldosteron.

Abb. 1.3: Schematische Darstellung eines Gap junction Plaques und schematische Darstellung der Struktur eines Gap junction Kanals; Abbildung teilweise verändert aus (Söhl und Willecke 2004).

Abb 1.4: A) Schematische Darstellung des Aufbau eines Connexin-Protein. B) Schematische Darstellung eines Vollkanals einer Gap junction; Abbildung aus (Kumar und Gilula 1996).

Abb. 3.1: Gesamtansicht 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) eines ausgewählten Gefäßbaumabschnittes einer adulten Wildtyp-Maus.

Abb. 3.2: Detailansicht 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) einer adulten Wildtyp-Maus.

Abb. 3.3: Gesamtansicht 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) eines ausgewählten Gefäßbaumabschnittes einer 4 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus.

Abb. 3.4: Detailansicht 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) einer 4 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus.

Abb. 3.5: Detailansicht 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) einer 4 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus.

Abb. 3.6: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer 4 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus, juxtamedullärer Ausschnitt. Renin ist grün, Glattmuskelaktin rot und die Kolo-kalisation beider Proteine gelb dargestellt. 400-fache Vergrößerung.

Abb. 3.7: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer 4 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus, superfizieller Ausschnitt. Renin ist grün, Glattmuskelaktin rot und die Kolo-kalisation beider Proteine gelb dargestellt. 400-fache Vergrößerung.

Abb. 3.8: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer 4 Wochen alten Wildtyp-Maus Renin ist grün, Glattmuskelaktin ist rot dargestellt. 400-fache Vergrößerung.

Abb. 3.9: Gesamtansicht 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) einer 10 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus.

Abb. 3.10: Detailansicht 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) einer 10 Wochen alten AS-Cx40-/-Maus.

Abb. 3.11: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer 10 Wochen alten AS-Cx40/--Maus. Renin ist grün, Glattmuskelaktin rot und die Kolokalisation beider Proteine gelb dargestellt. 400-fache Vergrößerung.

Abb. 3.12: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer 10 Wochen alten AS-Cx40/--Maus. Renin ist grün, Glattmuskelaktin rot dargestellt. 400-fache Vergrößerung.

Abb. 3.13: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer 10 Wochen alten Wildtyp-Maus Renin ist grün, Glattmuskelaktin ist rot dargestellt. 400-fache Vergrößerung.

Abb. 3.14: Gesamtansicht 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) einer 16 Wochen alten AS-Cx40/--Maus.

Abb. 3.15: Detailansicht 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) einer 16 Wochen alten AS-Cx40/--Maus.

Abb. 3.16: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer 16 Wochen alten AS-Cx40/--Maus. Renin ist grün, Glattmuskelaktin rot und die Kolokalisation beider Proteine gelb dargestellt. 400-fache Vergrößerung.

Abb. 3.17: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer 16 Wochen alten AS-Cx40/--Maus. Renin ist grün, Glattmuskelaktin rot und die Kolokalisation beider Proteine gelb dargestellt. 400-fache Vergrößerung.

Abb. 3.18: Detailansicht 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) einer 16 Wochen alten AS-Cx40/--Maus.

Abb. 3.19: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer 16 Wochen alten AS-Cx40/--Maus. Renin ist grün, Glattmuskelaktin rot und die Kolokalisation beider Proteine gelb dargestellt. 400-fache Vergrößerung.

Abb. 3.20: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer 16 Wochen alten Wildtyp-Maus Renin ist rot, Glattmuskelaktin ist grün dargestellt. 400-fache Vergrößerung.

Abb. 3.21: Gesamtansicht 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) einer 22 Wochen alten AS-Cx40/--Maus.

Abb. 3.22: Detailansicht 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) einer 22 Wochen alten AS-Cx40/--Maus.

Abb. 3.23: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer 22 Wochen alten AS-Cx40/--Maus Renin ist grün, Glattmuskelaktin rot und die Kolokalisation beider Proteine gelb dargestellt. 400-fache Vergrößerung.

Abb. 3.24: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer 22 Wochen alten AS-Cx40/--Maus. Renin ist grün und Glattmuskelaktin ist rot dargestellt. 400-fache Vergrößerung.

Abb. 3.25: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer 22 Wochen alten Wildtyp-Maus Renin ist grün dargestellt. 400-fache Vergrößerung.

Abb.: 3.26: Gesamtansicht 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) einer 34 Wochen alten AS-Cx40/-Maus.

Abb. 3.27: Detailansicht 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) einer 34 Wochen alten AS-Cx40/-Maus.

Abb. 3.28: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer 34 Wochen alten AS-Cx40/-Maus Renin ist grün, Glattmuskelaktin rot und die Kolokalisation beider Proteine gelb dargestellt. 400-fache Vergrößerung.

Abb. 3.29: Detailansicht 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) einer 34 Wochen alten AS-Cx40/-Maus.

Abb. 3.30: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer 34 Wochen alten AS-Cx40/-Maus Renin ist grün, Glattmuskelaktin ist rot dargestellt. 400-fache Vergrößerung.

Abb. 3.31: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer 34 Wochen alten Wildtyp-Maus Renin ist grün, Glattmuskelaktin ist rot dargestellt. 400-fache Vergrößerung.

Abb.: 3.32: Gesamtansicht 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) einer 46 Wochen alten AS-Cx40/-Maus.

Abb. 3.33: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer 34 Wochen alten AS-Cx/-Maus Glattmuskelaktin ist rot dargestellt. 400-fache Vergrößerung.

Abb. 3.34: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer 46 Wochen alten AS-Cx/-Maus Renin ist grün, Glattmuskelaktin ist rot dargestellt. 200-fache Vergrößerung.

Abb. 3.35: Detailansicht 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) einer 46 Wochen alten AS-Cx40/-Maus.

Abb. 3.36: Detailansicht 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) einer 46 Wochen alten AS-Cx40/-Maus.

Abb. 3.36: Detailansicht 3D-Rekonstruktion der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) einer 46 Wochen alten AS-Cx40/-Maus.

Abb. 3.37: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer 46 Wochen alten AS-Cx/-Maus Renin ist grün, Glattmuskelaktin ist rot dargestellt. 400-fache Vergrößerung.

Abb. 3.38: Immunfluoreszenzfärbung am Paraffinschnitt einer 46 Wochen alten Wildtyp-Maus Renin ist grün, Glattmuskelaktin ist rot dargestellt. 400-fache Vergrößerung.

Abb 3.39: Graphische Darstellung der renalen Renin-mRNA-Level von Wildtyp- und AS-Cx40-/-Mäusen der Altersstadien 4.–34. Woche.

Abb. 4.1: Gegenüberstellung der 3D-Rekonstruktionen der Immunreaktionen von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) aller untersuchten Altersstadien der AS-Cx40-/-Mäuse nach zunehmenden Alter dargestellt.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria(e)
Abb.	Abbildung
ACE	angiotensin converting enzyme
AS	Aldosteronsynthase
AT1R	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
AT2R	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin
cDNA	copy deoxyribonucleic acid
Cx	Connexin
Cy2	Carbocyanin
CYP	Cytochrom P450
dd.	doppelt destilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENaC	epithelial Na channel
et al.	und andere
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-dehydrogenase
G	Glomerulus
HCL	Chlorwasserstoff
H2O bidest.	zweifach destilliertes Wasser
H2O2	Wasserstoffperoxid
HS	horse serum
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
h	human
Ig	Immunglobulin

JGA	juxtaglomerulärer Apparat
JG-Zelle	juxtaglomeruläre Epitheloidzelle
KCl	Kaliumchlorid
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KH ₂ KPO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	Knockout
m	mouse
mRNA	messenger ribonucleic acid
N ₂	Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO	Dinatriumhydrogenphosphat
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RGB	Rot-Grün-Blau
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
ROMK	Renal Outer Medullary Potassium (K) channel
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SEM	standard error of the mean
TRIS	Tris-(hydroxy-methyl-)amino- methan
TRITC	Tetramethylrhodamin
UV	Ultraviolett
V.	Vena(e)
WT	Wildtyp
3D	dreidimensional
%	Prozent

Physikalische, chemische und biologische Größen und Einheiten

°C	Grad Celsius
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde(n)
I.E.	internationale Einheit
l	Liter
M	molar
min	Minute(n)
pH	pH-Wert
sek	Sekunde(n)
U	Unit
v	volume
V	Volt
w	weight

Dezimale Vielfache und Teile von Einheiten

k	kilo (1×10^3)
m	milli (1×10^{-3})
μ	mikro (1×10^{-6})
n	nano (1×10^{-9})

7.3 Danksagung

Abschließend möchte ich all denen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Armin Kurtz für die Vergabe des Promotionsthemas und die wissenschaftliche Betreuung. Sein Interesse und die stets offene Türe seines Büros waren mir eine sehr große Stütze.

Besonders danken möchte ich Dr. Katharina Machura und Dr. Björn Neubauer für die geduldige und unermüdliche Unterstützung und die kompetente Betreuung über die ganze Zeit die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Dr. Christian Karger für die Hilfe bei Fragen und Problemen.

Danken möchte ich außerdem Anna M'Bangui, Gerda Treuner und dem Team des Lehrstuhl Physiologie I für die Einweisung und Unterstützung bei den wissenschaftlichen Arbeiten.

Meinen Nachbarn Roswitha und Norbert Guthard die mir einen ruhigen Ort zum Arbeiten zur Verfügung stellten.

Meinen Eltern die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglichten.

Zuletzt danke ich innigst meiner Frau und meiner Tochter die mir die notwendige Motivation für die Fertigstellung meiner Doktorarbeit aufrecht erhalten haben.

7.4 Erklärung

Diese Dissertation wurde angeregt und während der Ausarbeitung überwacht von Professor Doktor Armin Kurtz.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater und andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 26.06.2017

Franz-Xaver Schinabeck